

Optimierung der Kultur und Charakterisierung primärer embryonaler Hepatozyten der Ratte

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
Dissertation

von Eva Schmelzer
aus Göttingen

1. Referent: Prof. Dr. W.-D. Deckwer

2. Referent: Prof. Dr. A. Bader

eingereicht am: 21.02.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.06.2002

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Schmelzer E., Nuppenau R., Bader A. (2000). Culture of embryonal hepatocytes for liver support systems. (Poster). International Tissue Engineering Meeting, Innsbruck.

Schmelzer E., Bader A. (2001). Expansion and characterization of embryonic hepatocytes for the use in bioartificial liver support systems or drug screening models. (Vortrag). 1st Biennial Meeting of the European Tissue Engineering Society, 4th International Meeting of the Tissue Engineering Society International, Freiburg im Breisgau. Abstract in: *Tissue Engineering*, **7**(5):631.

Schmelzer E., Bader A. (2001). Kultur embryonaler Hepatozyten für den Einsatz im Leberbioreaktor (Vortrag). 2. Tissue Engineering Marathon, Frankfurt am Main.

Schmelzer E., Bader A. (2001). Proliferation and characterization of embryonic hepatocytes under various culture conditions for the use in basic research, drug screening models and bioartificial liver support. (Poster). Second Transdisciplinary Conference on Principles and Perspectives in Regenerative Medicine, Hannover.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Leber.....	3
1.1.1	Anatomie.....	3
1.1.2	Funktion.....	7
1.1.3	Leberstoffwechsel.....	9
1.1.4	Hepatozyten.....	10
1.1.5	Extrazelluläre Matrix.....	10
1.2	Lebertransplantation und Bioartifizielle Leber Support Systeme.....	12
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Isolation embryonaler Rattenhepatozyten.....	15
2.1.1	Isolation embryonaler Lebern.....	15
2.1.2	Mechanische Isolation embryonaler Hepatozyten.....	16
2.1.3	Enzymatische Isolation embryonaler Hepatozyten.....	16
2.2	Aussaat und Kultur der Hepatozyten.....	17
2.2.1	Beschichtungen und feeder-Zellen.....	18
2.2.2	Medien.....	20
2.3	Methoden.....	23
2.3.1	Zellzahlbestimmung.....	23
2.3.2	Albumin-ELISA.....	23
2.3.3	Glukose- und Laktatbestimmung.....	26
2.3.4	Messung der Cytochrom-P450-Aktivität.....	26
2.3.5	Kryotomschnitte adulter Lebern.....	28
2.3.6	Immuncytochemie.....	29
2.3.7	Albumin-mRNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	31
2.3.8	Analyse der Genexpression.....	34
2.3.8.1	Zellgewinnung.....	36
2.3.8.2	Spotten der DNA-Microarrays.....	37
2.3.8.3	RNA-Isolation.....	39
2.3.8.4	cDNA Synthese.....	42
2.3.8.5	Hybridisierung der Microarrays.....	44

2.3.8.6	Puffer.....	45
2.4	Statistische Analyse.....	47
2.4.1	Mittelwert.....	48
2.4.2	Mittlerer Fehler.....	48
2.4.3	Signifikanzanalyse.....	48
2.5	Chemikalien.....	51
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Zellisolation.....	56
3.2	Zellzahlbestimmung.....	57
3.2.1	Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz.....	58
3.2.2	Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz.....	61
3.3	Albuminkonzentration.....	64
3.3.1	Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz.....	65
3.3.2	Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz.....	66
3.4	Glukose- und Laktatbestimmung.....	71
3.4.1	Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz.....	72
3.4.2	Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz.....	72
3.5	Cytochrom-P450 Aktivität.....	79
3.6	Immuncytochemie.....	86
3.6.1	Kryotomschnitte adulter Lebern.....	89
3.6.2	Embryonale Hepatozyten in Kultur.....	90
3.6.2.1	Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz.....	90
3.6.2.2	Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz.....	94
3.7	Albumin-mRNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	105
3.7.1	Kryotomschnitte adulter Lebern.....	105
3.7.2	Embryonale Hepatozyten in Kultur.....	106
3.8	Analyse der Genexpression.....	108
3.9	Signifikanzanalyse.....	116
4	Diskussion.....	117
4.1	Expansion embryonaler Hepatozyten.....	119
4.2	Metabolische Kapazität.....	124
4.3	Analyse der Genexpression.....	133
5	Zusammenfassung.....	140
6	Abkürzungen.....	142

7	Literatur.....	144
---	----------------	-----

Anhang:	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

Kulturen primärer embryonaler oder adulter Hepatozyten besitzen ein breites Spektrum an Anwendungen. So ermöglichen sie als *in vitro* Modell Fragen zum Einfluß spezifischer Faktoren auf die Zell- und Organentwicklung zu beantworten. Des weiteren kann ihr Einsatz als pharmakologisches Testsystem („drug screening“) und im Leberbioreaktor („bioartificial liver support system“) als temporäres organunterstützendes/ersetzendes System im Falle von Leberversagen erfolgen.

Ziel dieser Arbeit ist es, am Modell der Ratte den Einfluß verschiedener Kulturbedingungen wie Medien, Matrices und Wachstumsfaktoren auf Proliferation und Differenzierung embryonaler Hepatozyten *in vitro* zu untersuchen. Mittels verschiedener Methoden erfolgt die Charakterisierung der *in vitro* generierten Hepatozyten um somit einen Vergleich mit der *in vivo* Situation zu ermöglichen. Speziell über Kulturen von Hepatozyten extrem früher embryonaler Stadien und den Einfluß verschiedener Kulturbedingungen ist bislang wenig bekannt.

Klinische bzw. pharmakologische Anwendungen, insbesondere jedoch der Einsatz einer Bioartifiziellen Leber, verlangen eine maximale Zellzahl und metabolisch aktive, differenzierte Zellen mit einer *in vivo* entsprechenden metabolischen Kapazität. Der Einsatz permanenter hepatischer Zelllinien (z.B. Hep-G2) würde zwar unproblematisch den Bedarf großer Zellmengen decken, doch die mangelnde komplexe metabolische Kapazität und die potentielle Gefahr einer Invasion der onkogenen Zellen in den Blutkreislauf des Patienten bei Einsatz im Bioreaktor lassen diesen fragwürdig erscheinen. Primäre adulte Hepatozyten können mittlerweile über längere Zeiträume in Kultur gehalten werden, unter geeigneten Kulturbedingungen mit nur geringem Verlust ihrer *in vivo* Eigenschaften. Speziell für den Einsatz im Leberbioreaktor wird jedoch eine maximale Anzahl von etwa $2,5$ bis $5 \cdot 10^{10}$ Hepatozyten benötigt, die bei dem Einsatz von autologen, also humanen Material, nicht zur Verfügung steht. Bei schon erfolgreich eingesetzten porcinen Hepatozyten im extrakorporalen Support besteht die Gefahr viraler Übertragungen, z.B. porciner endogener Retroviren (PERV) (Patience *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998; Nyberg *et al.*, 1999).

Aus diesen Gründen erscheint es deshalb sinnvoll, embryonale Hepatozyten mit wahrscheinlich höherem Proliferationspotential als adulte Hepatozyten maximal zu vermehren, um so aus einer minimalen Ausgangszellzahl eine größt mögliche Anzahl Hepatozyten zu gewinnen.

In dieser Arbeit sollte am Modell der Ratte der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf Proliferation und Differenzierung von embryonalen Hepatozyten untersucht und optimiert werden, die anschließend auf das humane System übertragen werden können.

Zur Charakterisierung kultivierter Hepatozyten ist es notwendig, die Physiologie der embryonalen und adulten Leber *in vivo* zu verstehen. Nachfolgend wird daher die Leber in ihrer Anatomie und Funktion erläutert.

1.1 Die Leber

Die Leber (das Hepar) ist mit einem Gewicht von bis zu 1800g die größte exokrine Drüse des Menschen und zentrales Stoffwechselorgan (Drenckhahn *et al.*, 1994). In der humanen embryonalen Entwicklung entsteht sie am Tag 18 der Gestation als Aussprossung von Endodermzellen aus dem Rumpfdarm (Dubois, 1963; Hamilton und Mossman, 1972), wobei erwähnt werden muß, daß von den unterschiedlichen Zelltypen der Leber nur Hepatozyten und Gallengangszellen endodermalen Ursprungs sind, wohingegen die Sinusendothelzellen, Kupfferzellen, Zellen der Glisson'schen Kapsel und Itozellen dem Mesoderm entstammen (Houssaint, 1980).

Die adulte Leber besteht neben den parenchymalen Hepatozyten (ca. 60-70 %) und Gallengangszellen (2-5 %) aus sinusoidalen Zellen, zu denen die Endothelzellen (ca. 19 %), die Kupffer-Zellen (Makrophagen, ca. 15 %), Ito-Zellen (Fettspeicherzellen, 5-8 %) und Pit-Zellen (Natürliche Killerzellen, ca. 1%) gehören (Fabrikant, 1968; Greengard *et al.*, 1972; Widmann *et al.*, 1972; Blouin *et al.*, 1977; Grant und Billing, 1977; Stöhr *et al.*, 1978; Bouwens *et al.*, 1990; Kuiper *et al.*, 1994).

1.1.1 Anatomie

Die adulte humane Leber [Abb. 1.1] besteht aus zwei großen Lappen, dem rechten (Lobus dexter) und linken (Lobus sinister), sowie zwei kleinen, dem Lobus quadratus und dem Lobus caudatus (Drenckhahn *et al.*, 1994). An die Leber assoziiert ist die Gallenblase (Vesica biliaris).

Der Bluteinstrom in die Leber erfolgt über zwei Gefäße, die Pfortader (Vena portae) und die Aorta hepatica. Über die Vena portae gelangt das venöse Blut aus Magen, Darm, Pankreas und Milz zur Metabolisierung in die Leber. Das sauerstoffreiche Blut der Aorta hepatica dient der Versorgung des Leberparenchyms. Der Blutausfluß erfolgt nach Passage der Leber durch die Venae hepaticae in die untere Hohlvene (Vena cava inferior).

Die Innervierung der Leber erfolgt sympathisch und parasympathisch. Sympathische und parasympathische Fasern umgeben die Aorta hepatica und gelangen so in das Parenchym.

Lymphkapillare durchziehen die Leber nahe den Blutgefäßen und treten an der Leberpforte als hepatische Lymphgefäße aus.

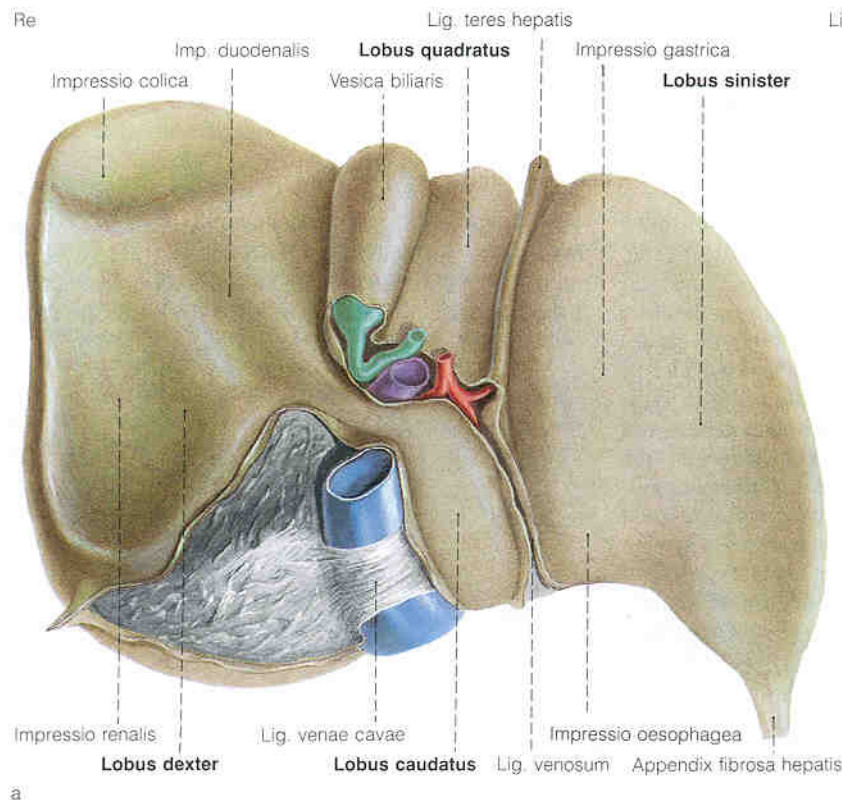


Abb. 1.1 Humane Leber in der makroskopischen Ansicht von kaudal, im Bild oben ventral, im Bild unten dorsal (Drenckhahn *et al.*, 1994).

In der mikroskopischen Betrachtung [Abb. 1.2] (Rappaport *et al.*, 1954) lässt sich die Aufgliederung der Leber in sich gleichende Kompartimente, die Leberläppchen (Lobuli hepatici), erkennen. Jedes Kompartiment ist etwa 2 mm³ groß, im Querschnitt sechseckig und wird im Zentrum von einer Zentralvene (Vena centralis) durchzogen. An den sechs Ecken eines Läppchens befindet sich jeweils das sogenannte Glissonnsche Trias (Trias hepatica), das aus den Ästen der Vena portae (V. interlobularis), der Aorta hepatica (A. interlobularis) und einem Gallengang besteht und auch als Portalkanal bezeichnet wird. Von den Arterien

und Venen in den Portalkanälen gehen feine Verzweigungen, die Arteriolen und Venolen, ab und verlaufen an den Seiten der Läppchen.

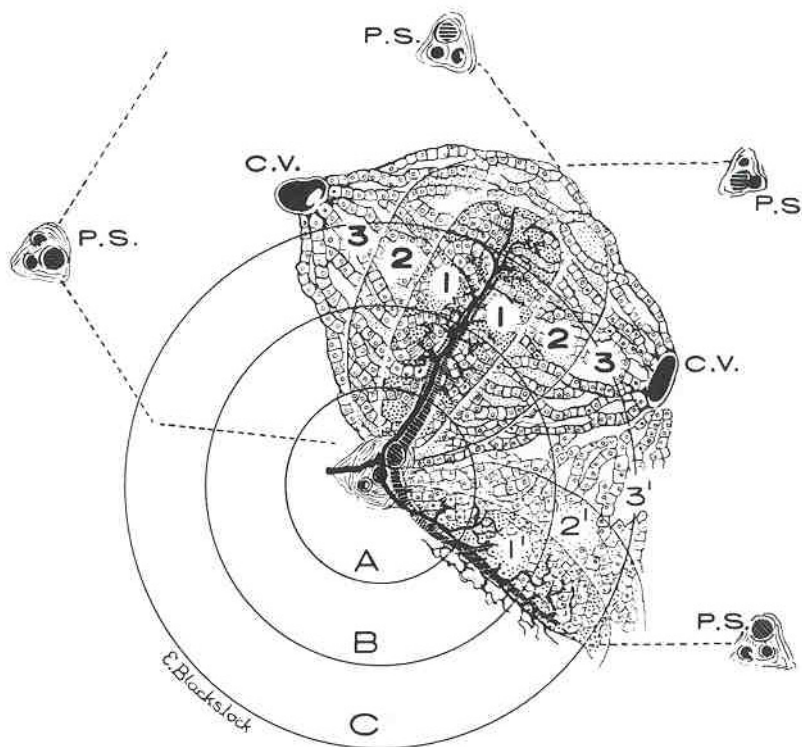


Abb. 1.2 Mikroskopische Anatomie eines Leberazinus, mit Zentralvene (C.V.), portalem Trias (P.S.) und den metabolisch unterschiedlich versorgten Zonen 1-3 und A-C (Rappaport *et al.*, 1954).

Als kleinste funktionelle Einheit wird der Leberazinus [Abb. 1.3] bezeichnet, nämlich der dreieckige Teil eines Läppchens, der aus einer Seite eines Läppchens bis zur Zentralvene gebildet wird. Das von den Arteriolen stammende sauerstoffreiche und Venolen metabolitreiche Blut fließt durch das Parenchym in Richtung Zentralvene, wobei entsprechend die Sauerstoffversorgung der Hepatozyten in Richtung Zentralvene abnimmt (Zonen 1-3 und A-C Abb. 1.2). Der Gallenfluß erfolgt konträr in Richtung Gallengang.

Der Azinus besteht aus balkenartig, in Richtung Zentralvene strahlenförmig angeordneten Hepatozyten. Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Sinusoide, feine Kapillaren, die von der Aorta hepatica und ihren Ästen sowie der Vena portae und ihren Ästen gespeist werden und über welche die Blutversorgung des Parenchyms in Richtung Zentralvene stattfindet. Die Sinusoide sind mit Endothelzellen ausgekleidet, die siebplattenartig fenestriert sind. Die

Endothelzellen sind nicht direkt mit den Hepatozyten verbunden, sondern von ihnen durch den Disse'schen Spalt getrennt. In diesem Raum befinden sich Laminin, Fibronektin, Proteoglykane und Kollagenfibrillen. Durch die Fenestrierung der Endothelzellen können alle löslichen Bestandteile des Blutes passieren und in den Disse'schen Raum eindringen, in dem die Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen.

Die von den Hepatozyten produzierte Galle wird in die Gallenkapillare abgegeben, die durch den Hering-Kanal in den Gallengang fließt.

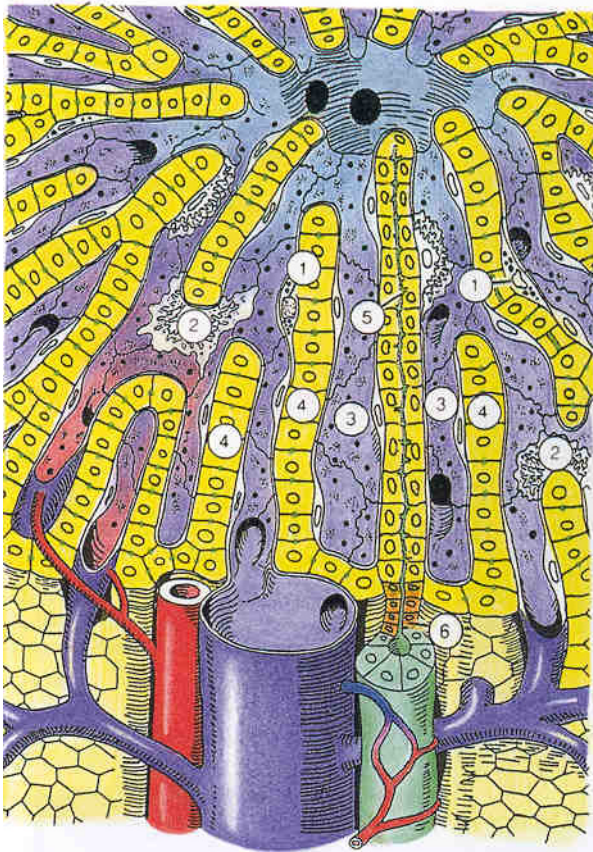


Abb. 1.3 Leberazinus

Im unteren Abschnitt setzt sich das Portale Trias zusammen aus Ästen der V. portae, der A. hepatica und dem Gallengang (von links nach rechts). Im oberen Abschnitt befindet sich die Zentralvene. 1 = Fettspeicherzelle, 2 = Kupferzelle, 3 = Sinusendothelzelle, 4 = Hepatozyten, 5 = Gallenkapillare, 6 = Heringkanal. Zwischen der Zentralvene und den Ästen der A. hepatica verläuft der Sinusoid, gebildet von den Endothelzellen (Motta *et al.*, 1978).

1.1.2 Funktion

Die humane Leber wird von etwa 1,5 l Blut pro Minute durchspült. Als zentrales Stoffwechselorgan und größte Drüse des Körpers finden in ihr lebenswichtige und äußerst komplexe Reaktionen statt:

- Blutbildung. Die Leber ist Hauptort der Blutbildung während der Embryonalentwicklung. In der humanen Entwicklung erreicht sie ihren Höhepunkt zwischen dem 6. und 7. Schwangerschaftsmonat, in der Ratte von Tag 14 bis 16 der Embryonalentwicklung. Zum Zeitpunkt der Geburt ist bei beiden Spezies die Blutbildung nicht mehr relevant.
- Häm-Degradation. Das in der Milz durch Abbau der Erythrozyten entstehende Häm wird zu Bilirubin degradiert und an Albumin gebunden. Durch Glucurinisation des lipophilen Bilirubins mit Glucuronsäure wird die Wasserlöslichkeit stark erhöht und der Komplex kann mit der Galle über den Darm ausgeschieden werden.
- Bereitstellung eines Aminosäurereservoirs für Serumproteine (wie Albumin) und Proteinbiosynthese
- Harnstoffsynthese zur Ammoniakentgiftung
- Regulation des pH-Wertes im Blut
- Regulation des Glukosespiegels im Blut durch Glukogenese, Glykolyse und Glukoneogenese, Speicherung von Kohlenhydraten in Form von Glykogen, Konvertierung von Lactat, Pyruvat u.a. zu Glukose
- Synthese und Abbau von Lipiden (Cholesterin, Triglyceriden), zentrales Organ des Fettstoffwechsels
- Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin
- Regulation und Speicherung von Vitaminen und Spurenelementen (Vitamin A, D, K, B12, Eisen, Magnesium, Kupfer usw.)
- Bildung von Koagulationsfaktoren wie Prothrombin und Fibrinogen
- Phagozytose von Bakterien und Zellfragmenten durch Kupfferzellen
- „Acute Phase Response“. Bildung von Proteinaseinhibitoren (alpha1-Antitrypsin, -Antichymotrypsin u. a.) und Koagulationsproteinen und -faktoren (Prothrombin, Fibrinogen, Hemopexin) bei Verletzungen und Entzündungen angeregt durch Zytokine wie Interleukin-1, -6 und Tumor Nekrose Faktor

- Detoxifikation von Xenobiotika in zwei Phasen:
 - Phase 1: Oxidation und Reduktion der Xenobiotika durch Enzyme des Cytochrom-P450-Systems
 - Phase 2: Konjugation mit Hilfe verschiedener Enzyme (z.B. Gluthation-S-Transferase, Glucuronyltransferase) zwecks Erhöhung der Wasserlöslichkeit und Exkretion

Das Cytochrom-P450-System

Die Leber stellt das „Entgiftungsorgan“ im Säugetierorganismus dar. Dabei fällt dem Cytochrom-P450-System (CYP450) eine wesentliche Rolle zu, nämlich als primäres Zentrum zur Dekontamination körpereigener und –fremder Substanzen durch Oxidation und Reduktion (Lewis, 1996). In konventioneller Zellkultur zeigt sich nach kurzer Zeit ein Verlust dieser spezifischen Stoffwechselleistung (Crocchi und Williams, 1985; Paine, 1990). Es ist jedoch gerade in der Kultur von Hepatozyten äußerst wichtig, diese differenzierten Funktionen aufrecht zu erhalten. Der Nachweis von Cytochrom-P450 Aktivität und Expression (sowohl direkt durch Messung der Enzymaktivität als auch indirekt durch Immunocytochemie oder Genexpression) in Kultur ist somit ein wichtiger Parameter, der Rückschlüsse auf Funktionsfähigkeit und Differenzierungsgrad der Hepatozyten zulässt.

Die ersten Nachweise, daß ein enzymatisches System der Leber am endoplasmatischen Reticulum fähig ist, Xenobiotika zu oxidieren, wurden von Brodie *et al.*, 1955, und Mason *et al.*, 1955, erbracht. Das charakteristische Absorptionsmaximum des Enzymkomplexes bei 450 nm führte zur Namensgebung (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Bis heute wurden über 230 verschiedene CYP450 charakterisiert, von denen die meisten in der Leber von Säugetieren vorkommen (Paine, 1981). Einige Cytochrome werden jedoch auch in anderen Organen exprimiert wie der Niere, der Lunge und der Haut (Smith *et al.*, 1982; Mukhtar und Khan, 1989). Ebenso ließen sich spezifische Cytochrome in Vögeln und Fischen, Reptilien, Amphibien, Insekten, Pflanzen, Bakterien und Pilzen nachweisen (Bozak *et al.*, 1990; Reichhart *et al.*, 1979;

Andersson und Förlin, 1992; Feyereisen, 1993; Nelson *et al.*, 1993; Cohen und Feyereisen, 1995).

1.1.3 Leberstoffwechsel

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan steht im Mittelpunkt der Regulation des Blutglukosespiegels und koordiniert die Versorgung von Gehirn, Muskulatur und Fettgewebe (Domagk *et al.*, 1978; Seifter und England, 1994).

Für die Muskulatur und das Gehirn ist Glukose der bevorzugte Energielieferant. In der Muskulatur können aber auch Fettsäuren und Ketonkörper unter Energiegewinnung metabolisiert werden und Glykogen kann gespeichert werden. Wichtig zu erwähnen ist, daß die Zellen der Muskulatur wie auch des Gehirns keine Glukose-6-Phosphatase besitzen und somit Glukose nicht an das Blut abgeben können. Im sogenannten Cori-Zyklus wird das im arbeitenden Muskel entstehende Laktat aus dem Glukoseabbau bzw. Alanin aus dem Proteinabbau zur Leber transportiert und in der Glukoneogenese mit Hilfe der dort vorhandenen Glukose-6-Phosphatase zu Glukose umgewandelt und somit dem restlichen Organismus wieder zur Verfügung gestellt. Die Leber selber bevorzugt nicht Glukose sondern Ketosäuren aus dem Aminosäureabbau als Energielieferant und kann somit als altruistische Versorgungszentrale angesehen werden. Im Fettgewebe können Glukose und Fettsäuren, von der Leber geliefert, in Form von Triacylglycerinen gespeichert werden. Durch Spaltung können Glycerin und Fettsäuren (gebunden an Albumin) wieder in der Leber verstoffwechselt werden. Die Regulation des Blutglukosespiegels in der Leber erfolgt hauptsächlich hormonell durch Insulin, Glukagon sowie Adrenalin und Noradrenalin.

Die normale Konzentration von Glukose im Blut beträgt 0,8 – 1,2 g pro Liter (Cardell und Cardell, 1993). Durch eine erhöhte Konzentration von Glukose im Blut wird die vermehrte Bildung von Insulin (im Mittel 0,1 nM im Blut) im Pankreas angeregt. Insulin bewirkt einen verbesserten Eintritt von Glukose in Fett- und Muskelzellen, eine erhöhte Glykolyse in der Leber, eine Verminderung der Glukoneogenese, eine Anregung der Glykogen- und Fettsäuresynthese und Triacylglycerinspeicherung sowie eine Hemmung des Proteinabbaus. Bei einer erniedrigten Konzentration von Glukose im Blut wird vermehrt Glukagon vom Pankreas gebildet. Dieses regt den Glycogenabbau und Glukoneogenese an und

verhindert die Glykogen- und Fettsäuresynthese, somit wird der Glukosespiegel im Blut erhöht. Noradrenalin und Adrenalin wirken wie Glukagon, zusätzlich bewirkt Adrenalin eine vermehrte Glukagonproduktion und vermindert die Insulinsekretion.

1.1.4 Hepatozyten

Die parenchymalen Zellen der Leber besitzen eine polygonale Struktur und eine Polarität. Diese wird verursacht durch ihre Anordnung zum einem in der Nachbarschaft zu angrenzenden Hepatozyten mit zahlreichen gap junctions und zum anderen durch den Kontakt zum Sinusoid über den Disse'schen Raum mit Mikrovilli (Hong, 1993). Der Durchmesser eines Hepatozyts beträgt etwa 30 µm, circa 80% der Zellen besitzen einen Zellkern, 20 % zwei (Wilson und Leduc, 1948). Etwa 40% der Hepatozyten sind diploid, 50-60% sind tetraploid und 5-10% oktaploid (Carriere, 1969). In jeder Zelle befinden sich bis zu 2000 Mitochondrien und ein stark entwickeltes glattes (u.a. Sitz des Cytochrom-P450-Systems) und raues (u.a. Synthese von Serumproteinen wie Albumin) Endoplasmatisches Reticulum, welches insgesamt 15 % des Zellvolumens einnimmt. Zusätzlich enthält jeder Hepatozyt etwa 300 Lysosomen und Peroxisomen sowie 50 Golgiapparate (Reddy und Rao, 1987; Miyai, 1991).

1.1.5 Extrazelluläre Matrix

Die Kenntnis über die extrazelluläre Matrix der Leber *in vivo* (Martinez-Hernandez, 1984; Martinez-Hernandez und Amenta, 1993) ist Voraussetzung für eine optimale Kultur von Hepatozyten *in vitro*, da die Kulturmatrix einen entscheidenden Einfluß auf den Phänotyp und die leberspezifischen Funktionen ausübt (Roijkind *et al.*, 1980; Reid *et al.*, 1984; Schuetz *et al.*, 1988; Bissell *et al.*, 1987; Stamatoglou und Hughes, 1994; Bader *et al.*, 1996).

Generell ist die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix für jedes Organ einzigartig, sie variiert zwischen verschiedenen Regionen innerhalb eines Gewebes und verändert sich stark während der Ontogenese. Im Gegensatz zu anderen Organen wie z.B. Niere oder Lunge nimmt die Matrix der Leber nur einen geringen Teil des Gesamtvolumens ein.

80% des Volumens der Leber wird von den verschiedenen Zelltypen gebildet, 20% von extrazellulärer Matrix und extrazellulären Zwischenräumen (Rojkind und Greenwell, 1994). In der adulten Leber kann zwischen drei Regionen unterschieden werden, die sich in ihrer Matrixzusammensetzung (Martinez-Hernandez, 1984) unterscheiden: Die Leberkapsel, der Portale Raum und mit größtem Anteil die Läppchen.

Die Leberkapsel ist eine feine, unter 1 mm dünne Membran, welche die Leber umgibt. Eine einlagige Schicht Mesothelialzellen adhäriert auf einer Membran aus Laminin, Entactin, Collagen IV und Perlecan. Darunter befindet sich ein Stützgerüst aus Collagen I Fasern durchzogen von Fasern und Filamenten aus Collagen III, V, VI und Fibronektin.

Die Gefäße des Portalen Raums sind in extrazellulärer Matrix eingebettet. Die Epithelzellen des Gallenganges sind umgeben von Collagen IV und Laminin. Die Äste der A. hepatica und V. portae dagegen befinden sich in einer Matrix aus Collagen I, III, V, VI, und Fibronektin.

Die extrazelluläre Matrix des Leberläppchens ist einzigartig in ihrer Zusammensetzung. Im Gegensatz zu Zellen anderer Organe besitzen Hepatozyten keine Basalmembran. Der 1 µm kleine Disse'sche Raum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen, durch den alle Moleküle aus dem Plasma über die Endothelzellen zu den Hepatozyten gelangen, ist angefüllt mit dicken Collagen I Fasern. Fibronektin verbindet Endothelzellen und Hepatozyten mit den Collagen I Fasern. Im geringeren Anteil sind Collagen III, IV, V und VI sowie Laminin und Perlecan vorhanden.

Die Matrixzusammensetzung der adulten Leber unterscheidet sich stark von derjenigen der embryonalen Leber (Martinez-Hernandez und Amenta, 1993). Im ersten Stadium der Hepatogenese (bei der Ratte am Embryonaltag 8,5, bei dem Menschen in der 4. Woche nach Befruchtung), bildet sich ein hepatisches Divertikel aus dem Darmrohr. Diese Leberanlage wird von einer Schicht Mesothelzellen umgeben, die von den embryonalen Hepatozyten durch eine Matrix getrennt werden, die hauptsächlich aus Laminin und Collagen IV besteht. Der noch nicht vollständig ausgeprägte Disse'sche Raum enthält überwiegend Laminin, Fibronektin und Collagen IV, im minimalen Anteil Collagen I. In der weiteren Entwicklung nimmt der Anteil von Laminin und Fibronektin im Gegensatz zu Collagen IV stark zu. Ab Tag 19,5 in der Embryonalentwicklung der Ratte

nimmt der Anteil an Laminin konstant stark ab. Die Matrixzusammensetzung entspricht nach einer Woche der Geburt (die am 22. Tag der Entwicklung stattfindet) der des adulten Tieres.

1.2 Lebertransplantation und Bioartifizielle Leber Support Systeme

Die Lebertransplantation ist meist die einzig lebensrettende Maßnahme bei akutem Leberversagen sowie einer Vielzahl chronischer, zum Teil vererbbarer Krankheiten. Nach den Nierentransplantationen sind in Deutschland Lebertransplantationen die zweithäufigste Art der Transplantation [Abb. 1.4]. 1998 warteten in Deutschland 1013 Menschen auf eine Lebertransplantation, davon erhielten 699 ein Transplantat, aber 142 Patienten verstarben während der Wartezeit (Eurotransplant, 2001). In den USA warten etwa zehnmal mehr Menschen auf eine Spenderleber als in Deutschland.

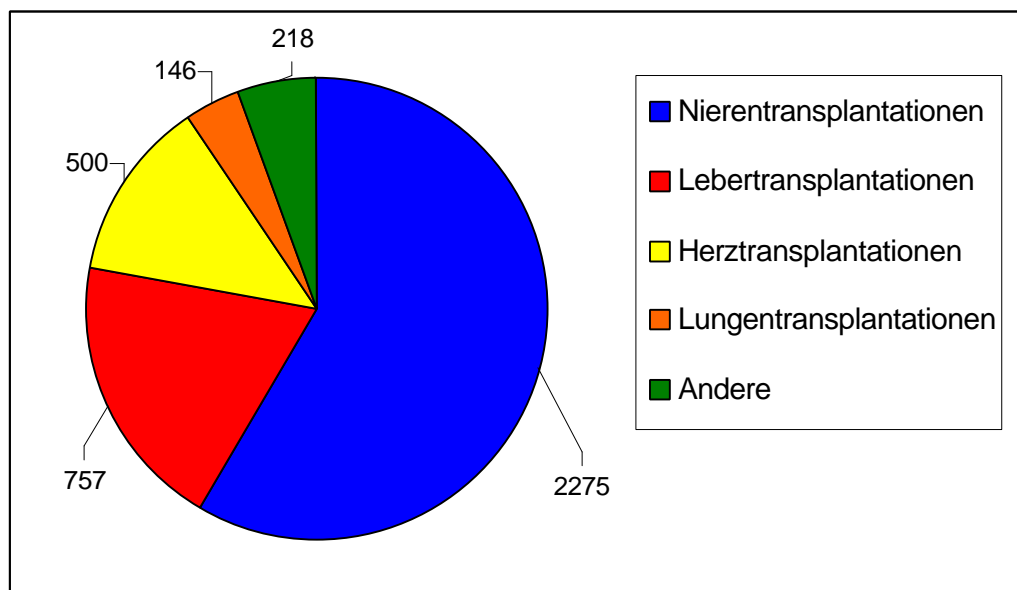


Abb. 1.4 Organtransplantationen in Deutschland 1999 (Eurotransplant, 2001).

Tatsache ist, daß nicht ausreichend genug Spenderorgane, vor allem im Fall des akuten Leberversagens, zur Verfügung stehen. Eine mögliche Lösung zur Behebung dieses Organmangels ist die Konstruktion und der Einsatz einer Bioartifiziellen Leber. Im Gegensatz zur Niere sind die Aufgaben der Leber im

Körper äußerst komplex, so daß der Einsatz von primären Hepatozyten unvermeidlich ist. Zelllinien sind mit ihrem begrenzten Potential an komplexen leberspezifischen metabolischen Funktionen (wie z.B. Detoxifikation) kein geeigneter Ersatz (Wang *et al.*, 1998; Donato *et al.*, 1999). Tierische primäre Zellen tragen das Risiko viraler Infektionen in sich wie z.B. PERV, porcine endogene Retroviren (Martin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998).

Der erste Versuch, die Leber in ihrer Funktion zu unterstützen, erfolgte von Kimoto (Kimoto, 1959), der eine Hemodialyse zwischen einem Hund und einem Menschen vornahm. Bislang wurden klinische Einsätze mit Bioartifiziellen Leber Support Systemen im Stadium akuten Leberversagens an Menschen mit porcinen Hepatozyten (Margulis *et al.*, 1989; Margulis *et al.*, 1990; Neuzil *et al.*, 1993; Rozga, 1993a; Rozga *et al.*, 1993b; Chen *et al.*, 1997; Gerlach *et al.*, 1997, Watanabe *et al.*, 1997), Kanninchen Hepatozyten (Matsumara *et al.*, 1987) und Leberzelllinien (Sussman *et al.*, 1992; Sussman und Kelly, 1993; Wood *et al.*, 1993) durchgeführt.

Die adulte humane Leber besteht aus etwa $2 \cdot 10^{11}$ Zellen, für einen effizienten Lebersupport werden 10 – 20 %, d.h. $2,5 - 5 \cdot 10^{10}$ Zellen, dieser Menge benötigt. Da humane adulte Zellen nicht in ausreichender Menge vorhanden sind, erscheint es sinnvoll, embryonale (humane) Zellen mit erhöhtem Proliferationspotential maximal zu vermehren, um so aus einer geringen Ausgangsmenge maximale Zellzahlen zu gewinnen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, *in vitro* die Proliferation und Differenzierung embryonaler Hepatozyten zu untersuchen. Am Modell der Ratte sollen daher die Kulturbedingungen embryonaler Hepatozyten variiert und optimiert werden.

Dazu werden zum einen verschiedene Isolationsmethoden der Hepatozyten und Dissoziationen der Zellen aus dem Organverbund angewendet. Zum anderen soll in der Kultur der Einfluß diverser Matrices und Medien, des Serumgehaltes sowie verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und Differenzierung der Hepatozyten untersucht werden.

Die Zellvermehrung wird mit Hilfe von Zellzahlbestimmungen ermittelt.

Die Expression leberspezifischer Funktionen soll nachgewiesen werden anhand von:

- Messung der Albuminsekretion in den Zellkulturüberstand und Nachweis durch enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Immunocytochemie gegen Albumin, alpha-Fetoprotein, Glutathion-S-Transferase und die Cytochrom-P450 Enzyme 1A1, 2B1, 2E1 und 3A2
- Enzymaktivitätsmessungen des Cytochrom-P450 Systems (EROD, PROD und ECOD)
- Nachweis der Albumin mRNA mittels *in situ* Hybridisierung
- Messungen des Glukose- und Laktatumsatzes im Zellkulturüberstand
- Analyse der Genexpression mittels DNA-Chiptechnologie

2 Material und Methoden

2.1 Isolation embryonaler Rattenhepatozyten

Neben der angestrebten Optimierung der Kulturbedingungen embryonaler Hepatozyten wurde auch die Isolation der Hepatozyten unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um somit optimale Zellausbeuten und -vitalitäten zu erhalten. So wurde die Isolation der Hepatozyten mechanisch oder enzymatisch mit Papain oder Collagenase durchgeführt. Die hier als optimal ermittelte Isolationsmethode wurde auf alle weiteren Versuche angewendet.

2.1.1 Isolation embryonaler Lebern

Embryonale Rattenhepatozyten wurden aus Lebern von Embryonen im Embryonalentwicklungsstadium (E) 12 bis 14 Tage post coitum isoliert.

Dazu wurden trächtige Ratten (*Rattus norvegicus*, Sprague Dawley) [Medizinische Hochschule Hannover] in Ätheratmosphäre betäubt. Betäubte Ratten wurden mit 200 µl Ketanest und 150 µl Rompun pro Ratte durch intraperitoneale Injektion narkotisiert und relaxiert.

Nach alkoholischer Desinfektion der Bauchseite wurde der Bauchraum eröffnet und der Uterus steril entnommen. In einer mit gekühlter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gefüllten Petrischale wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert. Embryonen wurden in eiskaltem Minimal Essential Medium Hanks (MEM), 25 mM HEPES gesammelt. Mit Hilfe eines Binokulars (Stemi 2000, Zeiss) wurden die Lebern aus den Embryonen präpariert.

2.1.2 Mechanische Isolation embryonaler Hepatozyten

Die präparierten Lebern wurden in eiskaltem MEM, 25 mM HEPES, Glutamax aufbewahrt und in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml MEM, 25 mM HEPES, Glutamax, 0,05% DNase gesammelt. Die Lebern wurden mittels einer angeschmolzenen 1 ml Kunststoffpipettenspitze ca. fünfmal trituiert. Die grob zerkleinerten Lebern inkubierten 15 min bei 37°C im Wasserbad, danach erfolgte ca. zehnmals Trituieren mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze. Nach erneuter Inkubation für 15 min bei 37°C im Wasserbad bzw. direkt nach einmaliger Inkubation für 15 min wurde nochmals ca. zehnmal mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze bis zur Homogenität trituiert.

Die Suspension der Hepatozyten wurde 5 min bei 243 g, RT, zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt, 1 ml MEM, 25 mM HEPES, 0,05% DNase hinzugefügt und das Pellet durch ca. fünfmaliges Trituieren mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze resuspendiert.

Es erfolgte eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer, anschließend die Aussaat der Hepatozyten (siehe 2.2).

2.1.3 Enzymatische Isolation embryonaler Hepatozyten

Präparierte Lebern wurden in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml MEM, 25 mM HEPES, Glutamax, 0,05% DNase und 0,2% Papain oder 0,6% Collagenase gesammelt und mit einer angeschmolzenen 1 ml Kunststoffpipettenspitze ca. fünfmal trituiert. Die grob zerkleinerten Lebern inkubierten 15 min bei 37°C im Wasserbad, danach erfolgte ca. zehnmals Trituieren mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze. Nach erneuter Inkubation für 15 min (bei Ansätzen mit 30 min Gesamtinkubationsdauer) bei 37°C im Wasserbad wurde nochmals ca. zehnmal mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze bis zur Homogenität trituiert.

Die Suspension der Hepatozyten wurde 5 min bei 243 g, RT, zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt, 1 ml MEM, 25 mM HEPES, 0,05% DNase

hinzugefügt und das Pellet durch ca. fünfmaliges Trituieren mit einer angeschmolzenen 100 µl Kunststoffpipettenspitze resuspendiert.

Es erfolgte eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer, anschließend die Aussaat der Hepatozyten (siehe 2.2).

2.2 Aussaat und Kultur der Hepatozyten

Isolierte Hepatozyten wurden in 37°C temperiertes William's Medium E (WE) aufgenommen. Dieses wurde supplementiert mit 5% FCS, Glukagon 0,1 µg/ml, Insulin 10 µg/ml, Dexamethason 0,7 µg/ml und Gentamycin 50 µg/ml.

Nach Bestimmung der geeignetsten Isolationsmethode wurden alle Aussaaten und Versuche mit Hepatozyten durchgeführt, die 2 x 15 min mechanisch isoliert wurden.

Die Aussaat erfolgte mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/cm². Je nach Versuch wurde in unterschiedlichen wells bzw. Flaschen [Falcon, bzw. 4 well Platte Nunc] ausgesät. Dabei wurde folgendes Volumen an Medium verwendet:

96 well Platte	50 µl/well
48 well Platte	300 µl/well
4 well Platte	300 µl/well
24 well Platte	500 µl/well
75 cm ² Flasche	20 ml
175 cm ² Flasche	50 ml

Ausgesäte Hepatozyten wurden in einem Inkubator der Firma Heraeus [Cytoperm 2, Kendro, Hamburg] bei 37°C, 95% Luftfeuchte, 20% Sauerstoffgehalt und 5% Kohlendioxidgehalt kultiviert.

2.2.1 Beschichtungen und feeder-Zellen

Die Aussaat der Hepatozyten erfolgte in wells oder Flaschen [Falcon] mit unterschiedlichen Beschichtungen bzw. auf konfluent gewachsenen feeder-Zellen. Die Beschichtung wurde direkt auf der Kunststoffoberfläche angelegt, für einige immuncytochemische Färbungen erfolgte die Beschichtung auf Glasslides (12 mm Durchmesser), die in 4 well Platten eingelegt und kultiviert wurden.

Collagen I

Collagen I [Becton Dickinson] wurde mit steriler 0,02 N Essigsäure verdünnt, so daß eine Konzentration von 10 µg/cm² erreicht wurde. Nach dem Ausplattieren der Lösung wurde mindestens 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden Lösungsüberstände abgesaugt und die Oberfläche einmal mit sterilem demin. H₂O zur Säurebeseitigung gewaschen. Geöffnete Platten wurden unter der Sterilbank getrocknet. Getrocknete Platten wurden bis zur Verwendung (1 bis 2 Tage) im Kühlschrank aufbewahrt.

Laminin

Tiefgefrorenes Laminin [Becton Dickinson] wurde bei 4°C aufgetaut. Alle Pipettievorgänge wurden mit gekühlten Spitzen ausgeführt. Mit kalter steriler PBS wurde das Laminin auf eine Konzentration von 10 µg/cm² verdünnt. Die Lösung wurde auf Glasslides oder wells auftragen und mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und einmal mit sterilem demin. H₂O gewaschen. Geöffnete Platten wurden unter der Sterilbank getrocknet. Getrocknete Platten wurden bis zur Verwendung (1 bis 2 Tage) im Kühlschrank aufbewahrt.

Collagen IV

Tiefgefrorenes Collagen IV [Becton Dickinson] wurde langsam bei 4°C aufgetaut und kurz und kräftig durchmischt. Mit steriler 0,05 N HCl wurde das Collagen auf eine Konzentration von 10 µg/cm² verdünnt. Die Lösung wurde auf Glasslides oder wells aufgetragen und mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und einmal mit sterilem demin. H₂O gewaschen. Geöffnete Platten

wurden unter der Sterilbank getrocknet. Getrocknete Platten wurden bis zur Verwendung (1 bis 2 Tage) im Kühlschrank aufbewahrt.

Matrigel

Tiefgefrorenes Matrigel [Wachstumsfaktor reduziert, Becton Dickinson] wurde auf Eis langsam aufgetaut. Alle Pipettiervorgänge wurden mit gekühlten Spitzen ausgeführt. Mit eiskaltem, serumfreien Medium wurde das Matrigel auf eine Konzentration von 10 µg/cm² verdünnt. Die Lösung wurde auf Glasslides oder wells auftragen und mindestens 1 h bei RT inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und einmal mit serumfreien Medium gewaschen. Die beschichteten Platten wurden direkt für die Zellkultur verwendet.

Feeder-Zellen

Als feeder-Zellen wurden 3T3 (swiss Albino Maus embryonale Fibroblasten Linie), MRC-5 (humane fötale Lungenfibroblasten Linie) sowie primäre Fibroblasten (embryonale primäre Fibroblasten aus der Kopfhaut der Ratte) benutzt.

Die Kultur der Zellen bis zum Zeitpunkt der Überschichtung mit embryonalen Hepatozyten erfolgte mit folgenden Medien:

3T3:

DMEM [mit L-Glutamin; 4,5 g/l Glukose] + 5% FCS + Gentamycin 50 µg/ml

MRC-5:

MEM [Earle's mit L-Glutamin] + 10% FCS + 1 mM Na-Pyruvat + Nichtessentielle Aminosäuren + Gentamycin 50 µg/ml

Primäre Fibroblasten:

DMEM/HamsF12 + 5% FCS + 15 mM HEPES + Gentamycin 50 µg/ml

Alle Zellen wurden kurz vor dem Erreichen der Konfluenz passagiert durch zweimaliges Waschen mit calcium- und magnesiumfreier PBS und anschließendem Ablösen mit 0,25% Trypsin. Nach Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von

3T3: 7.000 Zellen pro cm²

MRC-5: 10.000 Zellen pro cm²

Prim. Fibroblasten: 10.000 Zellen pro cm²

ausgesät.

Für den Einsatz als feederlayer wurden die Zellen 5 Tage vor der Besiedelung mit Hepatozyten im feeder-spezifischen Medium ausgesät. Die Aussaat von Hepatozyten erfolgte im supplementierten WE 5% FCS, nachdem das feeder-spezifische Medium abgesaugt worden war.

2.2.2 Medien

Sofort nach der Isolation wurden die embryonalen Hepatozyten in William's Medium E (WE) Medium aufgenommen und ausgesät. Das WE war supplementiert mit 5% FCS, Glucagon 0,1 µg/ml, Insulin 10 µg/ml, Dexamethason 0,7 µg/ml und 50 µg/ml Gentamycin. Nach einem Tag in Kultur erfolgte der erste Mediumwechsel, danach am zweiten Tag in Kultur und darauffolgend alle 2-4 Tage. Ab dem zweiten Tag in Kultur wurde je nach Versuchsansatz teilweise in Hybridomed DIF 1000 (DIF) oder WE kultiviert. Hybridomed DIF 1000 wurde supplementiert mit Glucagon 0,1 µg/ml, Dexamethason 0,7 µg/ml und 50 µg/ml Gentamycin, WilliamsE (WE) Medium wurde supplementiert mit 5% FCS oder serumfrei, Glucagon 0,1 µg/ml, Insulin 10 µg/ml, Dexamethason 0,7 µg/ml und 50 µg/ml Gentamycin.

Die Kulturen ohne Wachstumsfaktoren wurden in vier Ansätze aufgeteilt:

- A 48 h WE 5% FCS → WE 0% FCS
- B 24 h WE 5% FCS → DIF 0% FCS
- C 48 h WE 5% FCS → DIF 0% FCS
- D 48 h WE 5% FCS → WE 5% FCS

Die Kulturen mit Wachstumsfaktoren wurden in zwölf Ansätze aufgeteilt:

24 h WE 5% FCS → DIF 0% FCS mit Zusatz von

- 1 Kontrolle ohne Zusätze
- 2 HGF (20 ng/ml)
- 3 EGF (20 ng/ml)
- 4 TGF α (20 ng/ml)
- 5 TPO (10 ng/ml)
- 6 TPO (20 ng/ml)
- 7 HGF (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml)
- 8 HGF (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml), TPO (10 ng/ml)
- 9 HGF (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml), TPO (20 ng/ml)
- 10 HGF (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml), TGF α (20 ng/ml)
- 11 TPO (20 ng/ml), TGF α (20 ng/ml)
- 12 TPO (20 ng/ml), HGF (20 ng/ml)

Die Wachstumsfaktoren wurden bei -20°C gelagert und bei jedem Mediumwechsel frisch dazugegeben.

Medienzusammensetzungen:

Medien der Hepatozyten

Hybridomed DIF 1000 (DIF) [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]		Williams' Medium E (WE): [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	
CaCl ₂ *H ₂ O	131,55	CaCl ₂ *2H ₂ O	264,00
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,00125	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0001
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,417	Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O	0,0001
KCl	277,0	KCl	400,0
KNO ₃	0,038		
MgSO ₄ *7H ₂ O	100,04	MgSO ₄ *7H ₂ O	200,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	61,5		
		MnCl ₂ *4H ₂ O	0,0001
NaCl	5800,0	NaCl	6800,00
Na ₂ HPO ₄	54,5	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	158,0
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	81,67		
NaSeO ₃	0,01		
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,431	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,0002
NaHCO ₃	3610,0		
L-Alanin	17,0	L-Alanin	90,0
L-Arginin*HCl	100,0	L-Arginin	50,0
L-Asparagin*H ₂ O	40,0	L-Asparagin*H ₂ O	20,0
L-Asparaginsäure	36,0	L-Asparaginsäure	30,0
L-Cystein*HCl*H ₂ O	17,5	L-Cystein	40,0

Hybridomed DIF 1000 (DIF) [mg*l ⁻¹]		Williams' Medium E (WE): [mg*l ⁻¹]	
L-Cystin	35,5	L-Cystin	20,0
L-Glutaminsäure	80,0	L-Glutaminsäure	50,0
L-Glutamin	438,6	L-Alanyl-L-Glutamin	434,0
Glycin	30,0	Glycin	50,0
L-Histidin*HCl*H ₂ O	30,0	L-Histidin	15,0
L-Isoleucin	105,0	L-Isoleucin	50,0
L-Leucin	105,0	L-Leucin	75,0
L-Lysin*HCl	120,0	L-Lysin*HCl	87,0
L-Methionin	36,0	L-Methionin	15,0
L-Phenylalanin	50,0	L-Phenylalanin	25,0
L-Prolin	37,25	L-Prolin	30,0
L-Serin	52,5	L-Serin	10,0
L-Threonin	77,25	L-Threonin	40,0
L-Tryptophan	15,0	L-Tryptophan	10,0
L-Tyrosin	52,31	L-Tyrosin	35,0
L-Valin	70,0	L-Valin	50,0
D-Biotin	0,0101	Biotin	0,5
Cholinchlorid	8,98	Cholinchlorid	15,00
Folsäure	2,66	Folsäure	1,00
myo-Inositol	12,6	i-Inositol	2,00
Nicotinamid	2,0	Nicotinamid	1,00
D-Ca-Pantothenat	2,24	D-Ca-Pantothenat	1,00
Pyridoxin*HCl	0,031		
Pyridoxal*HCl	2,0	Pyridoxal*HCl	1,00
Riboflavin	0,219	Riboflavin	0,10
Thiamin*HCl	2,17	Thiamin*HCl	1,00
Vitamin B12	0,6865	Vitamin B12	0,20
D-Glukose	3650,0	D-Glukose	2000,0
Na-Pyruvat	330,0	Na-Pyruvat	25,00
2-Aminoethanol	1,2		
Hypoxanthin	2,04		
Thymidin	0,365		
Linolsäure	0,042	Methyl-Linoleat	0,03
Putrescin*HCl	0,0805		
Liponsäure	0,105		
(Phenolrot-Na	8,586)*	(Phenolrot	10,00)*
Rinderinsulin	10,0		
Rindertransferrin	10,0		
Rinderserumalbumin	1000,0		
Ölsäure	8,0		
		Ascorbinsäure	2,0
		Vitamin A-Acetat	0,10
		Ergocalciferol	0,10
		a-Tocopherolphosphat, Di-Na-Salz	0,01
		Menadion- Natriumbisulfat	0,01
		Glutathion	0,05

*Angaben in Klammern gelten nur für phenolrothaltiges Medium

Medien der feeder-Zellen:

3T3: DMEM mit L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose

MRC-5: MEM Earle's mit L-Glutamin, 1,0 g/l Glukose

Primäre Fibroblasten: DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin, 3,151 g/l Glukose

2.3 Methoden

2.3.1 Zellzahlbestimmung

Hepatozyten in Kultur wurden nach Aussaat in 96er-well Platten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur gezählt. Dazu wurde jedes well zweimal mit 100 µl calcium- und magnesiumfreier PBS gewaschen, danach wurde pro well 50 µl Trypsin 1,25% aufgegeben. Nach 20 min enzymatischer Aktivität bei 37°C wurde mit jeweils 50 µl FCS-haltigem Medium pro well die Trypsinaktivität abgestoppt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.3.2 Albumin-ELISA

Konzentrationen des von den Hepatozyten gebildeten Albumins wurden aus den Medienüberständen ermittelt. Dazu wurden bei jedem Mediumwechsel die Überstände vollständig abgenommen: Diese wurden in Eppendorfgefäßen gesammelt und bei -20°C bis zur Konzentrationsbestimmung gelagert. Parallel dazu wurden Aliquots der Medien als Leerwerte gesammelt.

Die Konzentration des gebildeten Albumins wurde mittels eines direkten Enzyme linked immuno sorbend assays (ELISA) bestimmt, d.h. das zu messende Protein wird direkt an die Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und durch Antikörper detektiert. Der ELISA wurde in 96 well Platten der Firma Nunc (Immuno Maxisorp) durchgeführt. Medienaliquots dienten als Leerwerte. Die Platten wurden im Absorptions- und Fluoreszenz-Microplatereader (FLI, Bio-Tek/Kontron, Neufahrn) gemessen.

Albumin-ELISA

1. Platte beschichten

- Jedes well mit 100 µl Standard bzw. Probe beschichten
- Standard: Albumin-Stammlösung (lyophilisiert, solubilisiert in PBS) [Ratten Albumin, ICN] mit coating buffer auf Konzentrationen von 0; 2,5; 5; 10; 25; 50; und 100 ng/ml verdünnen
- Proben: Proben und Leerwerte der Medien mit coating buffer 1:100 verdünnen
- Platte über Nacht bei 4°C oder 1h bei 37°C inkubieren

2. Platte blockieren

- wells viermal mit 1xPBS waschen
- Platte umdrehen und ausklopfen
- wells mit 100 µl blocking buffer blockieren
- Platte über Nacht bei 4°C oder 1h bei 37°C inkubieren

3. Antikörper anbinden

- wells viermal mit 1xTPBS waschen
- Platte umdrehen und ausklopfen
- 100 µl Antikörperlösung (1:10.000 verdünnt mit 1xTPBS) auf jedes well verteilen (rabbit anti rat albumin peroxidase conjugated, ICN, Lyophilisat solubilisiert in 2 ml demin. H₂O, ergibt einen Antikörperproteingehalt von 13,7 mg/ml)
- Platte über Nacht bei 4°C oder 1h bei 37°C inkubieren

4. Platte färben

- wells viermal mit 1xTPBS waschen
- Platte umdrehen und ausklopfen
- pro well 100 µl Substratlösung plus Substrat geben

- jedes well nach 10-15 min mit 100 µl Stopplösung abstoppen
- Extinktion bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 572 nm messen

Lösungen Albumin-ELISA

Coating buffer: Na_2CO_3 1,61 g
 NaHCO_3 2,93 g
 ad 1000 ml a.d., mit 1 N HCl auf pH 9,6 einstellen
 Filtrieren durch 2 µm Filter, Lagerung bei 4°C

Blocking buffer: 5% (w/v) Hefeextrakt in coating buffer

Waschpuffer: 5xTPBS:
 NaCl 40,00 g
 KCl 1,00 g
 KH_2PO_4 1,00 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,15 g
 TWEEN 20 2,50 g
 ad 1000 ml a.d., mit 2 N NaOH auf pH 7,4 einstellen
 Filtrieren durch 2 µm Filter, Lagerung bei 4°C,
 Gebrauchslösung verdünnen 1:5 mit a.d.

Substratpuffer: Na_3PO_4 14,8 g
 Zitronensäure-1-hydrat 7,2 g
 Ethylmecerithiosalicylsäure (Na-Salz) 0,1 g
 ad 1000 ml a.d., pH 5,5
 H_2O_2 (30%) frisch vor Gebrauch dazugeben: 1 µl/1 ml
 Substratpuffer

Substrat: o-Phenylenediamin Dihydrochlorid 1 mg/ml

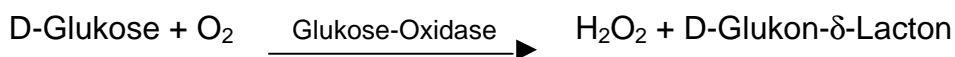
Stopplösung: ca. 20% H_2SO_4

2.3.3 Glukose- und Laktatbestimmung

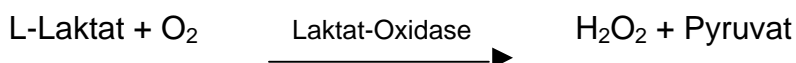
Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden aus den Medienüberständen und unbenutzten Medien als Leerwerte ermittelt. Bei jedem Mediumwechsel wurde jeweils das gesamte Medium in Eppendorfgefäßen gesammelt und bis zur Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Biochemischen Analysator [YSI 2700 select, Yellow Springs Instruments, Ohio, USA] anhand von Leitfähigkeitsveränderungen durch Bildung von H₂O₂ nach enzymatischer Reaktion. Dazu wurden für jede Messung 25 µl Probe entnommen. Die Analyse von Glukose und Laktat erfolgte gleichzeitig durch enzymatischen Substratumsatz an einer enzymschichteten Membran:

Glukose:



Laktat:



Anhand einer Eichlösung mit Konzentrationen von 1,8 (bzw. 2,5) g/l Glukose und 0,45 (bzw. 0,5) g/l Laktat [Kreienbaum] konnten Laktat- und Glukose-Konzentrationen simultan bestimmt werden.

2.3.4 Messung der Cytochrom-P450-Aktivität

(modifiziert nach Donato *et al.*, 1993)

Die Aktivität des Cytochrom-P450-Systems wurde an Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur untersucht. Es wurden die Aktivitäten der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), der 7-Pentoxyresorufin-O-deethylase (PROD) und der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) bestimmt. Konzentrationen von gebildetem Resorufin bzw. Hydroxycoumarin wurden fluorimetrisch mittels einer parallel angefertigten Eichreihe bestimmt.

Nach Aussaat der Hepatozyten auf 48-well Platten unterschiedlicher Beschichtung und feeder-Zellen in phenolrotfreies supplementiertes WE (5% FCS) erfolgte am

Tag 1 in Kultur ein Mediumwechsel auf phenolrotfreies supplementiertes DIF (0% FCS), ergänzt mit den jeweiligen Induktoren der Enzyme:

EROD, PROD	Methylcholanthren 2 µM (Stammlösung 2 mM in DMSO)
ECOD	Phenobarbital 2 mM (Stammlösung 2 M in DMSO)

Aktivitätstest

- pro well wurden 200 µl Substratlösung aufgegeben Diese bestand aus Medium mit folgenden Zusätzen:

EROD:	10 µM Ethoxyresorufin	(Stammlösung 10 mM in DMSO)
	2 µM Methylcholanthren	(Stammlösung 2 mM in DMSO)
	10 µM Dicumarol	(Stammlösung 10 mM in DMSO)
PROD:	10 µM Pentoxyresorufin	(Stammlösung 10 mM in DMSO)
	2 µM Methylcholanthren	(Stammlösung 2 mM in DMSO)
	10 µM Dicumarol	(Stammlösung 10 mM in DMSO)
ECOD:	10 µM Ethoxycoumarin	(Stammlösung 10 mM in DMSO)
	2 mM Phenobarbital	(Stammlösung 2 M in DMSO)

Kontrollen ohne Substrat aber mit Induktor und Dicumarol (EROD, PROD) wurden gleich behandelt. Bei Kultur auf feeder-Zellen wurden feeder-Zellen ohne Hepatozyten als Kontrollen kultiviert und gemessen

- die Inkubation der Zellkulturplatten erfolgte für 1 bis 2 h (unter exakter Notierung der jeweiligen Inkubationsdauer) bei 37°C im CO₂-Inkubator
- von jedem well wurde 75 µl Überstand abgenommen und in eine 96-well Platte transferiert
- Eichreihen wurden erstellt im Bereich von
0 – 25 µM Resorufin bzw.
0 – 20 µM Hydroxycoumarin
und parallel zu den Proben behandelt
- es erfolgte die Zugabe von 25 µl Enzymmix pro well bestehend aus 15 Fishman units beta-Glucuronidase und 120 Roy units Arylsulfatase verdünnt in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5
- die 96-well Platten wurden bei 37°C und ca. 550 rpm (Eppendorf Themomixer) für mindestens 2 h geschüttelt

- das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte pro well mit 200 µl Glycin-NaOH (1,6 M Glycin in 1,3 M NaOH, pH 10,3)
- die Fluoreszenzmessung wurde in einem Fluoreszenz-Microplatereader [FLI, Bio-Tek/Kontron, Neufahrn] durchgeführt mit einer Empfindlichkeit von 50 bei Wellenlängen von:
Resorufin: Excitation 530 nm, Emission 580 nm
Hydroxycoumarin: Excitation 360 nm, Emission 460 nm

Nach der Abnahme der Aliquots der Medienüberstände des Aktivitätstests wurde das gesamte Medium entfernt und durch frisches Medium (mit jeweiligem Induktor) ersetzt.

Die gemessenen Aktivitäten bei Kontrollen ohne Substrat wurden von den ermittelten Enzymaktivitäten subtrahiert. Bei Kultur auf feeder-Zellen wurden zusätzlich Aktivitäten der feeder-Zellen von denen der Hepatozyten subtrahiert.

2.3.5 Kryotomschnitte adulter Lebern

Kryotomschnitte adulter Lebern wurden als Positivkontrollen für Antikörperbindungen in der Immuncytochemie und Sondenbindung in der Albumin-mRNA *in situ* Hybridisierung eingesetzt.

Adulte Lebern wurden aus weiblichen trächtigen Sprague Dawley Ratten in Stücken entnommen, in Klarsichtfolie luftdicht verschlossen und bei -20°C gelagert. Zur Schnittanfertigung wurden Stücke bei -20°C in Einbettmedium [OCT, Leica] am Kryostatschnitthalter eingebettet. Am Kryotom [CM 2800 Frigocut, Leica] wurden bei -18°C Schnitte mit einer Dicke von ca. 12 µm angefertigt. Die Schnitte wurden mit auf Objektträger übertragen, die je nach späterer Verwendung zur Immuncytochemie oder mRNA *in situ* Hybridisierung unterschiedlich beschichtet waren.

Beschichtungen von Objektträgern für Immunhistochemie:

- 5 g Gelatine in 50 ml a.d. unter Erwärmen (ca. 60°C) auflösen
- auf 1000 ml mit a.d. auffüllen

- Zugabe von 0,5 g Chromalaun und 10 mg Thymol
- Gereinigte Objektträger eintauchen
- Über Nacht bei 37°C trocknen

Schnitte wurden wie Zellkulturen immunhistochemisch (siehe 2.3.6) weiterbehandelt.

Objektträger für mRNA *in situ* Hybridisierung:

- Objektträger 4 h bei 200°C ausbrennen
- Ausgekühlte Objektträger bei RT einmal kurz in Aceton tauchen
- 10 min inkubieren in 2% Silan-Acetonlösung (2% 3-Aminopropylethoxysilan in 100% Aceton)
- zweimal kurz in DEPC-H₂O (0,1% [v/v] DEPC in H₂O, autoklaviert) waschen
- Objektträger bei 60°C trocknen

Schnitte wurden wie Zellkulturen weiterbehandelt (siehe 2.3.7).

2.3.6 Immuncytochemie

Hepatozytenkulturen wurden nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur, sowie Schnitte adulter Lebern (siehe 2.3.5) immuncytochemisch untersucht.

Dazu wurde der Medienüberstand abgesaugt und jedes well einmal mit PBS gewaschen. Paraformaldehyd (4% w/v in PBS) wurde hinzugegeben, so daß die Zellen bedeckt waren. Die Schnitte wurden ungewaschen in PFA fixiert. Die Fixierung erfolgte 1 h bei RT. Das PFA wurde abgesaugt und jedes well dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (gelöst in PBS mit Zusatz von 0,3% Triton). Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde aufgegeben (mit Zusatz von 0,3% Triton in PBS) und Zugabe von 4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochloridhydrat (DAPI) 1:10.000 zur Kernfärbung. Jedes well wurde erneut dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Bei direkter Kultur in wells wurden diese mit PBS überschichtet und invers mikroskopiert, bei Kultur auf Glasslides wurden die Glasslides mit einer Pinzette entnommen, kurz in demin. H₂O getaucht (zur Vermeidung von Kristallbildung)

und getrocknet. Die slides wurden in Glyceringelatine auf Objektträgern zur dauerhaften Konservierung eingebettet und bei 4°C gelagert.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch [Axiovert S100, Zeiss] mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern und einer Digitalkamera [DC 200, Leica].

4% PFA-Lösung:

- 4% (w/v) para-Formaldehyd in PBS geben
- bei 55°C mindestens 1 h rühren
- nach Klärung in Eiswasser überführen
- über Faltenfilter filtrieren und Aliquots bei -20°C lagern

PBS:

- NaCl 9 g
- KH_2PO_4 122 mg
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 815 mg
- ad 1000 ml bidest, pH 7,4

Primäre Antikörper:

- GST (Glutathion-S-Transferase) Ya, 1:300, goat anti-rat [Natutec]
- Albumin, 1:300, rabbit anti-rat 5 mg/ml [ICN]
- AFP (alpha-Fetoprotein), 1:300, rabbit anti-rat [Chemicon]
- CYP (Cytochrom-P450)1A1, 1:100, goat anti-rat [Natutec]
- CYP2B1, 1:100, goat anti-rat [Natutec]
- CYP2E1, 1:100, goat anti-rat [Natutec]
- CYP3A2, 1:100, goat anti-rat [Natutec]

Sekundäre Antikörper:

- FITC (Fluorescein Isothiocyanate), 1:50, donkey anti-goat und donkey anti-rabbit [Dianova]
- TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate), 1:50, donkey anti-goat und donkey anti-rabbit [Dianova]

DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochloridhydrat, 1:10.000, Stammlösung 1 mg/ml [Sigma]

2.3.7 Albumin-mRNA *in situ* Hybridisierung

Bei der mRNA *in situ* Hybridisierung wird mit einer RNA-Sonde, die komplementär (anti-sense) zur Sequenz der zu detektierenden mRNA ist, an die mRNA gebunden, in diesem Fall die Albumin-mRNA. Als negativ Kontrolle dient eine sense-Sonde, welche die entsprechende Sequenz der Albumin-mRNA besitzt und dementsprechend nicht an die zu detektierende RNA binden kann.

Bei der Arbeit mit RNA Sonden mußte RNase frei gearbeitet werden, um einen enzymatischen Verdau der RNA zu verhindern; alle Puffer wurden daher mit DEPC-H₂O angesetzt.

Sense und antisense Sonden wurden im Labor unserer Arbeitsgruppe hergestellt und freundlicherweise von Herrn Dr. Just zur Verfügung gestellt. Dazu erfolgte die Amplifikation des 488 b langen Fragments mittels *in vitro* Transkription mit einem T-7 Promotor, der Nachweis über Northern Blot.

Die Spezifität der antisense und sense Sonden wurden an Kryostatschnitten adulter Lebern der Ratte nachgewiesen.

Die Zellen in Kultur wurden mit der antisense Sonde hybridisiert. Dazu wurden embryonale Hepatozyten ausgesät (siehe 2.2) in WE 5% FCS. Nach 1 Tag in Kultur erfolgte ein Mediumwechsel auf DIF 0% FCS ohne und mit Zusatz von Wachstumsfaktor (20 ng/ml Thrombopoietin). Nach 2 Tagen in Kultur erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Die Fixierung der Hepatozyten erfolgte am 5. Tag in Kultur.

Fixierung der Zellkulturen:

- Zellkulturmedium absaugen
- Kulturen 30 min bei Raumtemperatur mit PFA fixieren
- Zellen 2 x kurz mit 1 x PBS waschen

Hybridisierung:

- mit Hybridisierungspuffer 4 h bei 65°C vorhybridisieren
- über Nacht bei 65°C hybridisieren mit 200 ng RNA Sonde pro 1 ml Hybridisierungspuffer
- 1 min bei RT mit SSC-Puffer 1 waschen
- 3 x 20 min bei 65°C mit SSC-Puffer 2 waschen

- 1 min bei RT mit Waschpuffer 3 inkubieren
- 30 min mit Puffer 4 blockieren
- 60 min bei RT mit Antikörperlösung inkubieren (2 µl Antikörper-Stammlösung Anti-DIG-Alkalische Phosphatase in 10 ml Puffer 4)
- 4 x 20 min bei RT mit Waschpuffer 3 waschen
- 5 min bei RT mit Puffer 5 equilibrieren
- mindestens 2 h bei RT mit NBT/BCIP Substratlösung inkubieren
- 3 x 20 min bei RT mit PBS waschen
- bei zu starkem Hintergrund kurz mit 100% Ethanol waschen
- 2 x 5 min bei RT mit H₂O waschen
- wells oder slides trocknen und mit Kaisers Gelatine eindecken; dazu die Gelatine bei maximal 65°C verflüssigen, auf die Zellen aufgeben und mit einem Deckglas bedecken

Auswertung: Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Axiovert S100, Zeiss) mit Hilfe einer Digitalkamera (DC 200, Leica).

Lösungen:

DEPC-H₂O: 0,1 % (v/v) DEPC ad 1000 ml H₂O, autoklavieren

10 x PBS: NaCl 90 g
KH₂PO₄ 1,22 g
Na₂HPO₄*2H₂O 8,15 g
ad 1000 ml mit DEPC-H₂O, pH 7,4

4 % PFA: 4 % (w/v) PFA in 1 x PBS
bei 60°C unter Rühren lösen

Hybridisierungspuffer: NaCl 17,53 g
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 8,82 g
DEPC-H₂O 80 ml
Mit 1 N HCl auf pH 7,0
Blocking-Reagenz 4 g
10% N-Laurylsarcosin-Lösung 2 ml
10 % SDS-Lösung 400 µl
ad 100 ml mit DEPC-H₂O

	100 ml Formamid	
SSC-Puffer 1:	20x SSC	100 ml
	10% SDS-Lösung	10 ml
	ad 1000 ml mit DEPC H ₂ O	
SSC-Puffer 2:	20x SSC	10 ml
	ad 1000 ml mit DEPC H ₂ O	
20x SSC:	NaCl	3 M
	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,3 M
	Mit 1 N HCl auf pH 7,0, autoklavieren	
Waschpuffer 3:	100% Tween 20	500 µl
	10x Puffer 3	100 ml
	ad 1000 ml mit DEPC H ₂ O	
10x Puffer 3:	Maleinsäure	116,1 g
	NaCl	87,66 g
	ad 1000 ml mit DEPC H ₂ O, autoklavieren	
Puffer 4:	10% Blocking-Reagenz	2 ml
	30% Triton X-100	66,6 µl
	10x Puffer 3	2 ml
	ad 20 ml mit DEPC H ₂ O	
Puffer 5:	1 M Tris/HCl pH 9,5	50 ml
	1 M NaCl	50 ml
	ad 500 ml mit DEPC H ₂ O, vor Benutzung sterilfiltrieren	
1 M Tris-HCl pH 9,5:	Tris	121,1 g
	ad 500 ml mit DEPC H ₂ O, pH 9,5 mit HCl einstellen	
1 M NaCl:	NaCl	29,22 g
	ad 500 ml mit DEPC H ₂ O	
NBT/BCIP-Substratlsg.:	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	35 µl
	Nitroblautetrazoliumchlorid	45 µl
	Puffer 5	10 ml

2.3.8 Analyse der Genexpression

Die Genexpression wurde in embryonalen Hepatozyten in Kultur sowie in frisch isolierten embryonalen und adulten Hepatozyten untersucht.

Mit Hilfe der DNA-Microarray Technologie kann Genexpression im Hochdurchsatz parallel analysiert werden. Durch den Vergleich der leberspezifischen Expressionsprofile von adulten Hepatozyten *in vivo* mit denen der embryonalen Hepatozyten unter optimierten Kulturbedingungen können folgende Aussagen zum Status dieser Zellen getroffen werden:

- in wie weit kultivierte embryonale Zellen den adulten Hepatozyten gleichen und somit einen äquivalenten Ersatz, z.B. für den Einsatz im Bioreaktor oder als pharmakologisches Testsystem darstellen
- welchen Einfluß Wachstumsfaktoren, Matrices und feeder-Zellen auf das Expressionsprofil haben
- ob Ergebnisse von *in vitro* Tests spezifischer Leberfunktionen (Albuminproduktion, Cytochrom-P450-Aktivität, immunocytochemische Detektion verschiedener Proteine) sich im Expressionsprofil widerspiegeln

Ein DNA-Microarray ist ein beschichteter Glasobjektträger („Chip“), an dem kurze, synthetische DNA-Fragmente (Oligodeoxynukleotide) kovalent gebunden sind, welche die zu untersuchenden (hier zumeist leberspezifische) Gene repräsentieren (Abb. 2.1). Das bedeutet hier, daß 72 leberrelevante Gene ermittelt und ein aus je 50 Nukleotiden bestehendes genspezifisches DNA-Fragment an den Chip gebunden wurde. Aus adulten Lebergewebe und embryonalen Hepatozyten (unter verschiedenen Kulturbedingungen) wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden Fluorescein markierte Nukleotide verwendet. Die mit Fluorescein inkorporierte cDNA wurde fluoreszenzmarkiert, dabei wurden die Fluorescein markierten Nukleotide mit Cy3 (Cyanine-3-Tyramide) konjugiert. Die so hergestellte und markierte cDNA ist komplementär zu den DNA Sequenzen auf dem Chip. Mittels eines Laserscanners konnten die fluoreszierenden Emissionen quantifiziert werden. Durch vergleichende Auswertung zweier Proben, also z.B. embryonale und adulte Hepatozyten oder kultivierte embryonale Hepatozyten ohne Wachstumsfaktoren und mit

Wachstumsfaktoren, können Aussagen zum veränderten Expressionsprofil getroffen werden.

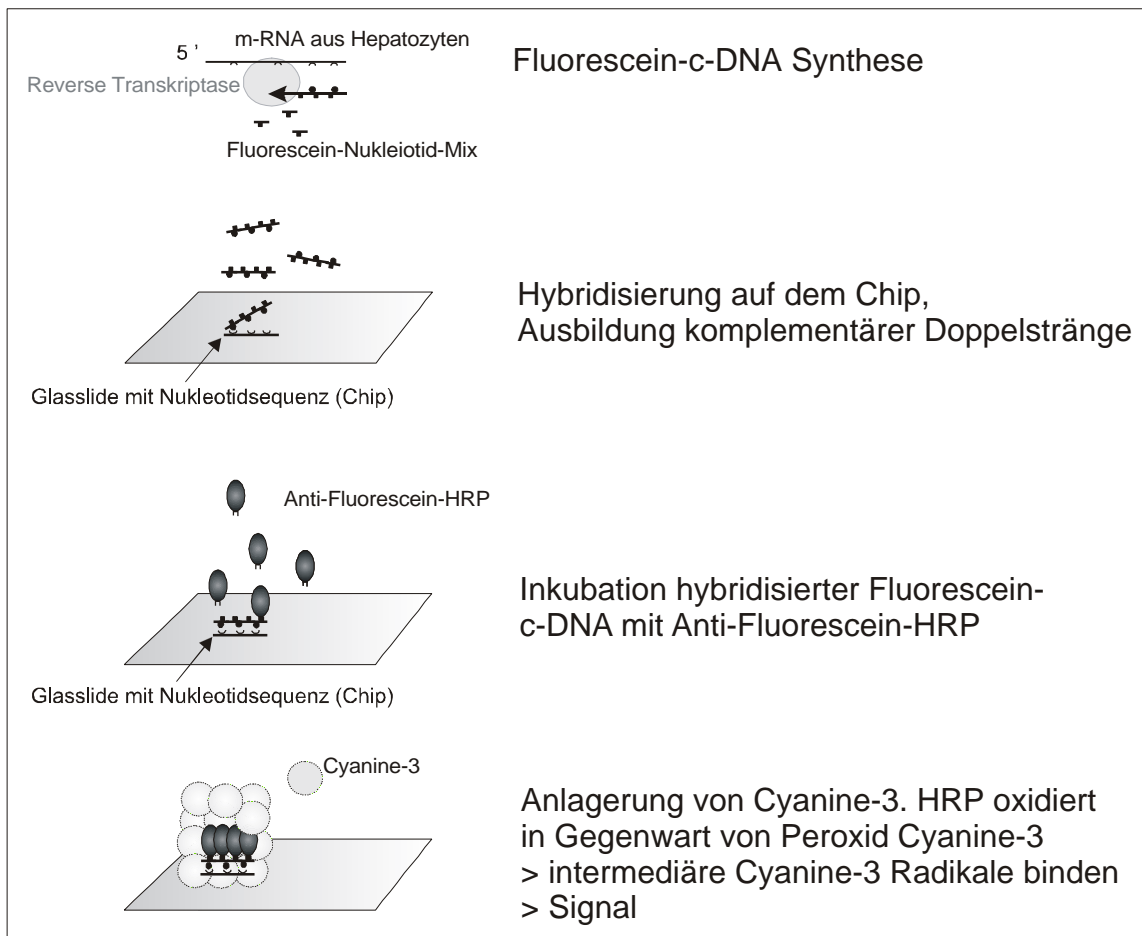


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der sekundären Signalverstärkung mit dem Micromax™ TSA™ Labelling and Detection Kit.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Microarrays wurde RNA von Hepatozyten aus adulten und embryonalen (E12) Lebern, sowie unter verschiedenen Bedingungen 5 Tage kultivierten embryonale Hepatozyten (E12) benutzt. Je Microarray wurde dabei exakt 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Der Einsatz einer konstanten RNA-Menge gewährleistet zum einen eine quantitative vergleichende Analyse der Meßwerte aus verschiedenen Kulturansätzen bzw. Lebern aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien miteinander. Zum anderen werden bei einem Einsatz konstanter RNA-Mengen Fehlerquellen aufgrund schwankender cDNA-Syntheseraten ausgeschlossen. Isolierte RNA aus Hepatozyten in Kultur auf feeder-Zellen wurde ebenfalls in einer Menge von 2 µg eingesetzt, obwohl diese sowohl feeder-Zell- als auch Hepatozyten-RNA enthielt. Es wurde daher das Verhältnis von Hepatozyten- zu Gesamt-RNA berechnet.

Entsprechend wurde dies als Faktor, in die Meßwerte (für die Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen) der relativen Intensität der Genexpression multipliziert. Dies könnte ein Kritikpunkt in der Beurteilung der Meßwerte für Kulturen auf feeder-Zellen sein, aber es scheint doch die Methode der Wahl zu sein. Denn zum einen besteht Linearität zwischen RNA-Menge und Fluoreszenzintensität, zum anderen wäre die alternative Möglichkeit des Vorgehens ungeeigneter, nämlich der Einsatz von entsprechend mehr RNA vor der cDNA-Synthese. Hierbei kann der Fehler durch eine veränderte cDNA-Synthesrate nicht ausgeschlossen werden. Eine Trennung der beiden Zellarten vor der RNA-Isolation war aus praktischen Gründen leider nicht möglich.

Alle Arbeiten müssen bis zur cDNA Synthese mit RNase freien Chemikalien und Materialien durchgeführt werden.

2.3.8.1 Zellgewinnung

Embryonale Hepatozyten in Kultur

Zellen wurden nach der Isolation (siehe 2.1.2) in 175 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen [Falcon] ausgesät. Nach fünf Tagen in Kultur auf verschiedenen Matrices mit und ohne Wachstumsfaktoren erfolgte die Ernte der Zellen. Dafür wurden die Flaschen zweimal mit calcium- und magnesiumfreier PBS gewaschen und die Hepatozyten mit 1,25%iger Trypsinlösung (20 min Verdau bei 37°C) abgelöst. Mit serumhaltigem Medium (2 x 10 ml) wurden die Zellen gesammelt, zentrifugiert (243 g, 5 min, RT) und der Überstand abgesaugt. Die Hepatozyten wurden in einem definierten Volumen von serumfreiem Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation (243 g, 5 min, RT) wurde der Überstand abgesaugt. Die Isolation der RNA erfolgte direkt nach der Zellgewinnung oder nach Aufbewahrung der Zellen bei -20°C.

Embryonale Hepatozyten

Hepatozyten wurden direkt nach der Isolation (siehe 2.1.1) gezählt, zentrifugiert (243 g, 5 min, RT) und das Pellet bei -20°C bis zur Isolation der RNA aufbewahrt bzw. ganze embryonale Lebern gesammelt und bei -20°C eingefroren.

Adulte Hepatozyten

Die RNA adulter Hepatozyten wurde aus adulten Lebern nicht trächtiger weiblicher Ratten gewonnen, die direkt nach der Präparation aus dem Bauchraum in kleinere Stücke geschnitten und in 45 ml RLT-Puffer (QIAGEN-Kit) + 450 µl β-Mercaptoethanol gegeben wurden. In einem 50 ml Falcon blue cap wurden die Leberstücke im Ultra Turrax für 45 s bei 24.000 rpm (Stufe 6) homogenisiert. Die weitere Behandlung zur RNA-Aufreinigung erfolgte wie im Abschnitt 2.3.8.3 beschrieben.

Folgende Ansätze wurden untersucht:

- Embryonale Hepatozyten nach 5 Tagen in Kultur (mit Mediumansatz 24 h WE 5% FCS, danach DIF 0% FCS mit bzw. ohne WF) auf:
 - Collagen IV + WF (je 20 ng/ml HGF und TPO)
 - Collagen IV – WF
 - Collagen I + WF (20 ng/ml TPO)
 - Collagen I – WF
 - 3T3 + WF (20 ng/ml TPO)
 - 3T3 – WF
- adulte Leber
- embryonale Leber (E12)

2.3.8.2 Spotten der DNA-Microarrays

Microarrays der Firma Telechem mit einer silanylierten Oberflächenbeschichtung (CSS-100 silylated slides) wurden mit dem GMS 417 Arrayer [GeneticMicroSystems] gespottet. Dazu wurden je 15 µl Oligonukleotid (100 µM) [MWG] mit 15 µl Array It Micro Spotting Plus Puffer 2x [Telechem] in der Vertiefung einer 96er Platte [Lafontain] vermischt. Alle 75 Oligonukleotide wurden in einem Arbeitsgang von dem Arrayer auf die slides aufgetragen.

Folgende, aus 50 Nukleotiden bestehende Sequenzen, wurden als dreifache Wiederholung auf einen Chip gespottet (Tabelle 2.1). Bei den vierfach vorliegenden Oligonukleotiden der mitochondrialen Cytochrom Oxidase (Nr. 14-17) erfolgte dies, um eine maximale Abdeckung des Gens zu gewährleisten.

Die Nukleotidsequenz des Albumins liegt hier in seiner um 24 Basen verlängerten Form Preproalbumin vor. Nach der Translation dient diese Sequenz als Signalpeptid zur Sekretion und wird bis zur Sekretion des Proteins abgespalten (Rothschild *et al.*, 1988).

Tabelle 2.1: Spotting des Ratten DNA-Microarrays.

Nr.	Accessionnr.	Name des Gens
00	AB017801	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
01	AF056333	Cytochrom-P450 2E1
02	AF106624	Galactosid- β -1,3-glucuronyltransferase
03	AF110478	Aldehydoxidase
04	AF135059	Fibrillin-1
05	AF135060	Fibrillin-2
06	AH002183	Haptoglobin
07	NM_013151	Plasminogenaktivator
08	D10554	hepatocyte nuclear factor-4
09	D37951	c-myc intron binding protein 1
10	D38380	Transferrin
11	D83481	Cysteindioxygenase
12	E16456	neuregulin-like transmembrane activator for ErbB kinases
13	J00696	α -1-Acidglycoprotein
14	J01435	Mitochondriale Cytochromoxidase (Subunits I,II, III)
15	J01435	Mitochondriale Cytochromoxidase (Subunits I,II, III)
16	J01435	Mitochondriale Cytochromoxidase (Subunits I,II, III)
17	J01435	Mitochondriale Cytochromoxidase (Subunits I,II, III)
18	J02596	Apolipoprotein C-III
19	J02597	Apolipoprotein A-I
20	J02635	α -2-Macroglobulin
21	J02720	Arginase
22	J03752	Glutathion-S-Transferase
23	04218	Glucokinase
24	K03248	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
25	K03252	Transthyretin
26	L02896	Heparansulfatproteoglycan (Glypican)
27	L07114	Apolipoprotein B editing protein
28	L19706	Histone 3
29	L47281	Collagen 4 α -3
30	M10149	Aldolase B
31	M11266	Ornithintranscarbamylase
32	M15327	Alkoholdehydrogenase
33	M15797	Entactin
34	M16454	Akutphase α -1-Protein (Thiostatin)
35	M22427	basic fibroblast growth factor
36	M23601	Monoaminoxidase B
37	M26125	Epoxidhydrolase
38	M31363	Hydroxysteroidsulfotransferase

Nr.	Accessionnr.	Name des Gens
39	M32247	α -1-Antitrypsin
40	M35826	Mitochondriale NADH-Dehydrogenase
41	M35991	liver fatty acid binding protein
42	M37394	epidermal growth factor receptor
43	M57718	Cytochrom-P450 4A1
44	M62642	Hemopexin
45	M91652	Glutaminsynthetase
46	M92042	N-Heparansulfatsulfotransferase
47	NM_012493	α -Fetoprotein
48	NM_012540	Cytochrom-P450 1A1
49	NM_012669	hepatic nuclear factor-1
50	NM_012671	transforming growth factor α
51	NM-012747	signal transducer and activator of transcription 3
52	NM_012766	Cyclin D3
53	NM_012824	Apolipoprotein C1
54	NM_012901	α -1 Microglobulin
55	NM_013089	Glycogensynthase 2
56	NM_017003	avian erythroblastosis viral (v-erb-B2) oncogene homologue 2 (Erb-B2)
57	NM_017009	glial fibrillary acidic protein
58	NM_017060	H-ras
59	NM_019143	Fibronectin 1
60	NM_021578	transforming growth factor β -1
61	NM_022298	α -Tubulin
62	U05675	Fibrinogen B β chain
63	U09742	Cytochrom-P450 3A2
64	U25651	Phosphofruktokinase
65	U65007	hepatocyte growth factor receptor (c-met)
66	U79118	Aldehyddehydrogenase
67	V01222	Preproalbumin
68	X06769	c-fos
69	X14223	Glutamatdehydrogenase
70	X14977	Mitochondriale Aldehyddehydrogenase (Leber)
71	X17163	c-jun
72	X86561	α Fibrinogen
73	X97541	signal transducer and activator of transcription 5b
74	Y08882	Laminin

2.3.8.3 RNA-Isolation

Die RNA der Hepatozyten wurde mit RNeasy midi bzw. maxi Kits [Qiagen] isoliert, Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf Volumina im maxi Kit. Bei einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^7$ (embryonale Hepatozyten) erfolgte die Isolation im midi Kit, bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ bis $5 \cdot 10^8$ (adulte Hepatozyten) im maxi Kit.

- Pellet embryonaler Hepatozyten (eingefrorene Zellen auftauen) vortexen bzw. embryonale Lebern auftauen
- zu den Zellen bzw. embryonalen Lebern 2,0 [15] ml RLT Puffer (Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1,0 ml RLT Puffer) geben
- je 1 ml in ein Hybaid Ribolyser Green Tube geben
- Zellen in Green Tubes im Hybaid Ribolyser 20 s bei 6 m/s homogenisieren
- Green Tubes zum Abkühlen für 10 min auf Eis lagern
- Zellsuspension embryonaler Hepatozyten oder homogenisierte adulte Hepatozyten aus dem Ultra Turrax in ein Blue cap (Falcon) überführen und 2,0 [15] ml 70 % Ethanol hinzufügen, gründlich vortexen
- Suspension auf eine RNeasy midi [maxi] Säule, platziert in ein 15 [50] ml tube, geben
- Säule bei ca. 400 g 5 min zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- auf die Säule 4,0 [15] ml Puffer RW1 geben, 5 min bei ca. 400 g zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- 2,5 [10] ml Puffer RPE auf die Säule geben, 2 min bei ca. 400 g zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- 2,5 [10] ml Puffer RPE auf die Säule geben, 5 min bei ca. 400 g zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- die Säule in ein neues 15 [50] ml tube geben, 250 [1200] µl RNase freies Wasser auf die Säule geben und für 1 min stehen lassen, zentrifugieren für 3 min bei ca. 400 g
- erneut 250 [1200] µl RNase freies Wasser auf die Säule geben, 1 min einwirken lassen und bei ca. 400 g 3 min zentrifugieren

Die so eluierte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert, mit einem Aliquot von je 5 µl wurden Konzentrationsbestimmungen durchgeführt.

Phenol-Chloroform Extraktion

Alle RNA-Proben in H_2O wurden aufgetaut und weiterverarbeitet

- Zugabe von 1 VT Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zur Probe
- 30 s vortexen
- 1 min zentrifugieren (Tischzentrifuge 13.000 rpm)

- RNA in obiger wässriger Phase abnehmen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- Zugabe von 1 VT Chloroform
- 30 s vortexen
- 1 min zentrifugieren (Tischzentrifuge 13.000 rpm)
- RNA in obiger wässriger Phase abnehmen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen

Die so gereinigte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert.

Ethanolfällung

- Zugabe von 1/10 VT NaCl 5 M und 2 VT Ethanol absolut, eiskalt
- mind. 45 min bei -70°C inkubieren
- 10 min zentrifugieren (Tischzentrifuge 13.000 rpm)
- Überstand absaugen und verwerfen
- Pellet in 300 μl 70% Ethanol resuspendieren
- 10 min zentrifugieren (Tischzentrifuge 13.000 rpm)
- Überstand absaugen und verwerfen
- Pellet lufttrocknen
- Pellet in 50 μl H_2O (RNase frei) aufnehmen

Die so gereinigte RNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert.

Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde durch Messung der optischen Dichte ermittelt. Dafür wurden 5 μl der eluierten RNA mit 495 μl TE-Puffer (pH 8,0) verdünnt (1:100) und die Extinktion gegen TE-Puffer (pH 8,0) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt Ammersham, [Ultraspec 3300pro]. Der Proteingehalt wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt.

Dabei entspricht

$$1 \text{ OD} \equiv 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Das Verhältnis von RNA- zu Proteinkonzentration sollte mindestens 1,60 betragen.

TE-Puffer 10x:

12,1 g Tris-HCl

20 ml 0,5 M EDTA

auf pH 8,0 einstellen, ad 1000 ml mit a.d., autoklavieren

2.3.8.4 cDNA Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte aus der gewonnenen RNA mit Hilfe eines Oligo dT Primers und Fluorescein markierten Nukleotiden. Nach Anbindung der markierten cDNA an die DNA auf dem Microarray wurde das Fluorescein mit fluoreszenten Cy3 konjugiert. Die Fluoresceinmarkierung stellt somit ein Signalverstärkungssystem dar, welches erlaubt, die initial eingesetzte RNA-Konzentration auf 2 µg zu reduzieren.

- Je Ansatz pipettieren:
 - 2 µg RNA
 - 1 µl Reaction Mix Concentrate
 - 1 µl Fluorescein-Nukleotide
 - 8 µl Oligo dT Primer (50 pmol/µl)
 - ad 20 µl mit RNase-freien H₂O auffüllen
- Inkubation für 10 min bei 65°C
- Inkubation für 5 min bei 25°C
- Inkubation für 3 min bei 42°C
- Zum Ansatz pipettieren:
 - 2,5 µl 10x RT Reaction Buffer
 - 2 µl AMV RT/RNase Inhibitor Mix
- Inkubation für 1,5 h bei 42°C
- Inkubation für 5 min auf Eis
- Zum Ansatz pipettieren:
 - 2,5 µl 0,5 M EDTA pH 8,0
 - 2,5 µl 1 N NaOH

- Inkubation für 30 min bei 65°C
- Inkubation für 5 min auf Eis
- Zum Ansatz pipettieren:
 - 6,5 µl 1 M Tris-HCl pH 7,5

Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit [Qiagen] durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der pH abhängigen Bindung der DNA an eine Säule mit einer Silica-Gel Membran. Dabei wird bei einem pH unter 7,5 (optimal 5,0) die cDNA an die Membran adsorbiert, störende Nukleotide und Proteine binden nicht. Durch Erhöhung des pH-Wertes auf über 7,5 wird die cDNA von der Säule eluiert.

- Zum Volumen der gewonnenen cDNA 5 Volumenteile PB Puffer geben und vortexen
- Gesamtes Volumen auf eine QIAquick Säule geben, die sich in einem 2 ml Reaktionsgefäß befindet, und 1 min bei ca. 10.000 g [Eppendorf Tischzentrifuge] zentrifugieren
- Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 700 µl Guanidinhydrochlorid 35% wässrige Lösung auf die Säule
- 1 min bei ca. 10.000 g zentrifugieren
- Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 750 µl PE Puffer auf die Säule
- 1 min bei ca. 10.000 g zentrifugieren
- Durchfluß verwerfen
- Säule 1 min bei ca. 10.000 g trocken zentrifugieren
- Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß geben
- 30 µl Elutionspuffer auf die Säule geben und 1 min stehen lassen
- 1 min bei ca. 10.000 g zentrifugieren

2.3.8.5 Hybridisierung der Microarrays

Vor der Hybridisierung mit cDNA auf dem gespotteten Microarray werden diese reduziert und blockiert. Dazu die Microarrays

- 4 h bei 50°C in feuchter Kammer im Wasserbad rehydratisieren
- 24 h im Dunkeln inkubieren
- 2 min mit 0,2% SDS waschen
- 2 x 1 min mit a.d. waschen
- 5 min in NaBH₄ reduzieren lassen
- 1 min in eiskaltem a.d. waschen
- 2 min mit 0,2% SDS waschen
- 2 x 1 min mit a.d. waschen
- lufttrocknen
- 45 min mit Blockingreagenz im Wasserbad bei 42°C blockieren
- 5 x 2 min mit a.d. waschen
- lufttrocknen
- im Dunkeln lagern

Hybridisierung der cDNA auf den Microarray

Zur Hybridisierung der Proben auf den Microarray wurde die jeweilige cDNA im Elutionspuffer vakuumgetrocknet, in Hybridisierungspuffer resuspendiert und auf den Microarray appliziert. Das Protokoll erfolgte modifiziert mit dem NEN[®] Micromax[™]TSA[™] Labeling and Detection working protocol [Perkin Elmer]:

- cDNA Probe (im Elutionspuffer) im geöffneten Eppendorf Reaktionsgefäß bei 30°C für 30 min im Vakuum [Concentrator 5361, Eppendorf] einrotieren
- Pellet in 20 µl Hybridisierungspuffer [Telechem] lösen
- 3 min bei 95°C denaturieren
- 1 min auf Eis abkühlen
- Probe auf Chip applizieren
- Deckglas luftblasenfrei aufgeben, Seiten des Deckglases mit Fixogum [Marabu] luftdicht verschließen

- Microarray in feuchter Kammer über Nacht bei 42°C hybridisieren
- Fixogum abziehen, Microarrays in Waschpuffer geben und schütteln:
- 5 min in Waschpuffer 1
- 5 min in Waschpuffer 2
- 2 min in Waschpuffer 3
- mit ImmEdgePen® [Vector Inc.] Rahmen um den gespotteten Bereich ziehen
- 300 µl TNB-G Blocking Puffer aufgeben, 10 min inkubieren
- 10 min Inkubation mit 200 µl Anti-FI-HRP Conjugate Solution (2 µl Anti-FI-HRP conjugate in 200 µl TNB-G)
- 3 x 1 min in TNT Puffer (42°C) waschen
- 10 min Inkubation mit 250 µl Cyanine-3 Tyramide Solution (0,5 µl Cyanine-3 Tyramide (gelöst in 20 µl DMSO) in 250 µl Amplification Diluent)
- 3 x 5 min in TNT Puffer (42°C) waschen
- 1 min in 0,06 x SSC waschen
- Slide im Falcon trockenzentrifugieren bei 1200 rpm für 2 min
- Microarray im Array Scanner (GMS 418 Microarrayscanner) bei Wellenlängen von Cy3: 532 nm scannen

Die Intensitäten der Fluoreszenzen wurden mit Hilfe des Programms ImaGene 4.1 [BioDiscovery Inc.] berechnet.

2.3.8.6 Puffer

NaBH₄

1 g NaBH₄

300 ml PBS

100 ml Ethanol absolut

0,5x SSC + 0,01x SDS

25 ml 20x SSC

1 ml 10% SDS

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, anschließend durch 0,22 µm Filter filtrieren

0,06x SSC + 0,01x SDS

3 ml 20x SSC

1 ml 10% SDS

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, anschließend durch 0,22 µm Filter filtrieren

0,06x SSC

3 ml 20x SSC

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, anschließend durch 0,22 µm Filter filtrieren

TNT-Puffer

15,76 g TrisHCl (→0,1 M)

8,766 g NaCl (→0,15 M)

500 µl Tween 20 (→0,05%)

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, anschließend durch 0,22 µm Filter filtrieren

TN-Puffer

1,576 g TrisHCl (→0,1 M)

0,8766 g NaCl (→0,15 M)

ad 100 ml mit a.d. auffüllen, anschließend durch 0,22 µm Filter filtrieren

TNB-Puffer

100 ml TN-Puffer

0,5 g Blocking Reagent (I)

die Lsg. soll klar werden → bei 60°C lösen, vor Gebrauch muß die Lsg. RT haben

Lagerung: Lsg. in Falcons a 9 ml aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

TNB-G-Puffer

9 ml TNB-Puffer

1 ml Goat-Serum

Waschpuffer 1 (0,5x SSC + 0,01% SDS)

25 ml 20x SSC

1 ml 10% SDS

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, durch 0,22 µm Filter filtrieren

Waschpuffer 2 (0,06x SSC + 0,01% SDS)

3 ml 20x SSC

1 ml 10% SDS

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, durch 0,22 µm Filter filtrieren

Waschpuffer 3 (0,06x SSC)

3 ml 20x SSC

ad 1000 ml mit a.d. auffüllen, durch 0,22 µm Filter filtrieren

20x SSC

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen

10% SDS

10 g Natriumdodecylsulfat

ad 100 ml mit a.d. auffüllen

2.4 Statistische Analyse

Neben der Berechnung und Darstellung der Mittelwerte und Mittlerer Fehler wurde anhand statistischer Analyse an ausgewählten Ergebnissen untersucht, ob sich die gemessenen Mittelwerte des Ansatzes x signifikant von denen des Ansatzes y unterscheiden. Von Interesse war hier, ob der Zusatz von einem oder mehreren Wachstumsfaktoren zu einer Zunahme der Zellzahl führte, die sich als signifikant bezeichnen läßt.

Äußerst wichtig ist die richtige Wahl des passenden Signifikanztestes für die zu untersuchenden Mittelwerte. Auf die Grundlagen soll hier nur kurz eingegangen werden, Entscheidungskriterien erfolgten unter Zuhilfenahme entsprechender Literatur (Köhler *et al.*, 1995; Kesel *et al.*, 1999). Da es sich um unverbundene, normalverteilte Stichproben mit relativer hoher Anzahl an Wiederholungen handelt, wurde zur Überprüfung auf Gleichheit der Mittelwerte der t-Test herangezogen.

2.4.1 Mittelwert

Der sich aus den einzelnen Meßwerten ergebende Mittelwert berechnet sich nach:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

wobei n den Stichprobenumfang und x_i die einzelnen Meßwerte darstellen.

2.4.2 Mittlerer Fehler

In die graphisch dargestellten Mittelwerte der einzelnen Ansätze wurde der positive und negative mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) durch Fehlerbalken eingefügt. Dieser berechnet sich nach:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

wobei s die Standardabweichung darstellt:

$$s = +\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

2.4.3 Signifikanzanalyse

Test auf Normalverteilung der Stichproben

Mit dem Schnelltest nach David und Mitarbeitern erfolgt die Überprüfung auf Normalverteilung der Stichproben.

Zu widerlegende Nullhypothese:

H_0 : Verteilung der Stichprobe = Normalverteilung

$$\text{Prüfgröße PG} = \frac{R}{s} = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{s}$$

Wobei s die Standardabweichung, R die Differenz aus dem größten und kleinsten Meßwert darstellt.

Berechnung der Freiheitsgrade:

$$n = n$$

Anhand der Tabelle für den David Schnelltest wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,050$ die obere und untere Signifikanzschranke ermittelt. Die Prüfgröße muß größer als die obere Signifikanzschranke oder kleiner als die untere Signifikanzschranke sein, damit die Nullhypothese verworfen werden darf.

Tabelle 2.2 David et al. Test. Auszug aus der Testtabelle für $\alpha = 0,050$.

n	UNTERE SCHRANKE	OBERE SCHRANKE
8	2,50	3,40
9	2,59	3,55
10	2,67	3,68
11	2,74	3,80
12	2,80	3,91

Test auf Gleichheit der Varianzen

Mit dem F-Test werden die Varianzen der Stichproben auf Gleichheit überprüft.

Nullhypothese

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

wobei s_1^2 und s_2^2 die Varianzen einer Stichprobe darstellen.

Prüfgröße $PG = F_{\text{berechnet}}$

$$F_{\text{berechnet}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Es muß darauf geachtet werden, daß die größere Varianz s_1^2 im Zähler, die kleinere s_2^2 im Nenner steht.

Berechnung der Freiheitsgrade:

$$n_1 = n_1 - 1$$

$$n_2 = n_2 - 1$$

dabei ist n_1 der Umfang der Stichprobe mit der größeren, n_2 mit der kleineren Varianz.

Anhand der Tabelle für den F-Test wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,050$ der berechnete F-Wert abgelesen, H_0 wird bei $F_{\text{berechnet}} = F_{\text{Signifikanzschranke}}$ verworfen.

Tabelle 2.3 F-Test. Auszug aus der Testtabelle für $\alpha = 0,050$.

n_1	7	8	9	10	11
n_2					
7	3,79	3,73	3,68	3,64	3,60
8	3,50	3,44	3,39	3,35	3,31
9	3,29	3,23	3,18	3,14	3,10
10	3,14	3,07	3,02	2,98	2,94
11	3,01	2,95	2,90	2,85	2,82

Test auf Gleichheit der Mittelwerte

Mit dem t-Test wird ermittelt, ob die Grundgesamtheiten, aus denen die beiden Stichproben stammen, sich signifikant unterscheiden.

Nullhypothese

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

wobei μ_1 und μ_2 die Mittelwerte einer Grundgesamtheit darstellen.

Bei gleich großen Stichprobenumfängen berechnet sich die Prüfgröße nach

$$PG = t_{\text{berechnet}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} \cdot \sqrt{n}$$

Bei unterschiedlich großen Stichprobenumfängen

$$PG = t_{\text{berechnet}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_t} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$\text{Mit } s_t = \sqrt{\frac{s_1^2 \cdot (n_1 - 1) + s_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade

$$n = n_1 + n_2 - 2$$

Die Prüfgröße $t_{\text{berechnet}}$ wird mit dem Tabellenwert der t-Test Tabelle verglichen. H_0 wird bei $t_{\text{berechnet}} = \text{Signifikanzschranke}$ verworfen. Getestet wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,050$.

Bei Zellzahlbestimmungen wird ein zweiseitiger Test durchgeführt, da durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren es theoretisch sowohl zu einer Zellzahlverminderung als auch –vermehrung kommen kann.

Tabelle 2.4 t-Test Tabelle. Auszug aus der Tabelle für Freiheitsgrade von 14 bis 22.

a	0,0500
2 a/2	0,1000
n	
14	1,7613
15	1,7531
16	1,7459
17	1,7396
18	1,7341
19	1,7291
20	1,7247
21	1,7207
22	1,7171

2.5 Chemikalien

Aceton	Baker B.V., Deventer, Holland
Albumin, Ratte	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
3-Aminopropylethoxysilan	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Antikörper Albumin Ratte (rabbit, Peroxidase konjugiert)	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Antikörper Albumin Ratte (rabbit)	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Antikörper a-Fetoprotein Ratte	Chemicon Inc., Hofheim
Antikörper FITC goat (donkey)	Dianova GmbH, Hamburg
Antikörper FITC rabbit (donkey)	Dianova GmbH, Hamburg

Antikörper CYP1A1 Ratte (goat)	Natutec, Frankfurt
Antikörper CYP2B1 Ratte (goat)	Natutec, Frankfurt
Antikörper CYP2E1 Ratte (goat)	Natutec, Frankfurt
Antikörper CYP3A2 Ratte (goat)	Natutec, Frankfurt
Antikörper GST Ratte (goat)	Natutec, Frankfurt
Antikörper TRITC goat (donkey)	Dianova GmbH, Hamburg
Antikörper TRITC rabbit (donkey)	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Schaf)	Böhringer GmbH, Mannheim
Blocking-Reagenz (<i>in situ</i> Hybridisierung)	Böhringer GmbH, Mannheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	Böhringer GmbH, Mannheim
Chloroform	Baker B.V., Deventer, Holland
Chromalaun	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Collagenase IV	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Collagen I	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Collagen IV	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
DAPI	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Desoxyribonuklease	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Dexamethason (water soluble)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Dicumaryl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Diethylether	Baker B.V., Deventer, Holland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
EDTA (Di-Na-Salz)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Eichlösung Glukose/Laktat	Kreienbaum e.K., Langenfeld
Einbettmedium OCT	Leica GmbH, Bensheim
Ethanol, p.A.	Baker B.V., Deventer, Holland
Ethanol, technisch	Baker B.V., Deventer, Holland
Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ethoxycoumarin	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck KG, Darmstadt
Ethylmethylthiosalicylsäure, Na-Salz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Foetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co., Tamm
Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
β -Glucuronidase/Arylsulfatase	Böhringer GmbH, Mannheim
Glukagon, human	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Glutamax	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Glycin	Merck KG, Darmstadt

Glyceringelatine, Kaisers	Merck KG, Darmstadt
Goat Serum	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hefextrakt	Difco Laboratories, USA
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
HEPES	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hydroxycoumarin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Insulin, human	Böhringer GmbH, Mannheim
KCl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ketamin 10	Atarost GmbH & Co., Twistringen
KH ₂ PO ₄	Merck KG, Darmstadt
Laminin	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Maleinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Matrigel, wachstumsfaktorreduziert	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Methylcholanthren	ICN Pharmaceuticals, Frankfurt
Natriumpyruvat	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
NaBH ₄	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
NaCl	Merck KG, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
NaHPO ₄ *2H ₂ O	Merck KG, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck KG, Darmstadt
Na ₃ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumcitrat	Merck KG, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Böhringer GmbH, Mannheim
NaOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
NEN [®] Micromax [™] TSA [™] Kit	Perkin Elmer, Boston, USA
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Nitroblautetrazoliumchlorid	Böhringer GmbH, Mannheim
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Oligonukleotid dT Primer	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
o-Phenylendiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Papain	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
PBS (Zellkultur)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PBS Ca- u. Mg-frei (Zellkultur)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pentoxeresorufin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Phenobarbital	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Resorufin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
RNeasy Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rompun	Bayer AG, Leverkusen
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
SDS	Böhringer GmbH, Mannheim
Thrombopoietin	CellSystems GmbH, St. Katharinen
Thymol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Transforming Growth Factor (TGF) α	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KG, Darmstadt
Triton x-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trizma® Base	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypanblau	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Zitronensäure-1-hydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Kulturmedien

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM/Hams F12	Biochrom KG seromed, Berlin
Hybridomed DIF 1000 (DIF)	Biochrom KG seromed, Berlin
Hybridomed DIF 1000 (DIF) phenolrotfrei	Biochrom KG seromed, Berlin
Minimal Essential Medium Earle's (MEM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Minimal Essential Medium Hank's (MEM)	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
William's Medium E (WE)	Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe
William's Medium E (WE) phenolrotfrei	Biochrom KG seromed, Berlin

Feeder Zellen

MRC-5 (CCL-171)	American Type Culture Collection, Manassas, USA
3T3 (ACC 173)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
primäre Fibroblasten	Eigene Präparation

3 Ergebnisse

Nachdem eine mechanische Isolation embryonaler Hepatozyten als optimal ermittelt wurde, erfolgten weitere Isolationen und Versuche stets mit mechanisch isolierten Hepatozyten.

Erste Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung auf verschiedenen Matrices und feeder-Zellen wurden mit vier verschiedenen Medienansätzen (A – D) ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Kultur wurde die Zellzahl, die Albuminsekretion, die Expression von primär leberrelevanten Enzymen und Serumproteinen mittels Immuncytochemie sowie Glukose- und Laktatkonzentrationen im Mediumüberstand bestimmt.

Um die Zahl der in Kultur generierten Hepatozyten zu maximieren, wurden in serumfreier Kultur (der sich in wachstumsfaktorfreier Kultur als optimal erwiesene Ansatz B) Zusätze von 11 Wachstumsfaktoren (einzeln oder in Kombination) erprobt. Mittels Zellzahlbestimmungen wurde der für jede Matrix bzw. feeder-Zellart optimale Wachstumsfaktor (bzw. -kombination) ermittelt. Hepatozyten mit diesem jeweils optimalen Wachstumsfaktor (bzw. -kombination) im Kulturmedium zeigten deutlich erhöhte Zellzahlen im Vergleich zu Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz. Mit Hilfe mehrerer Methoden wurde untersucht, inwieweit die mit optimalen Wachstumsfaktoren(-kombinationen) proliferierten embryonalen Hepatozyten leberspezifische Funktionen exprimierten: Albuminsekretion, Expression von Enzymen und Serumproteinen der Leber mittels Immuncytochemie, Glukose- und Laktatkonzentrationen im Kulturüberstand, Cytochrom-P450-Aktivität (EROD, ECOD, PROD), Albumin-mRNA Expression mittels *in situ* Hybridisierung sowie Genexpressionsanalysen mit DNA-Microarrays.

3.1 Zellisolation

Die Isolation der Hepatozyten erfolgte mechanisch oder enzymatisch mit Papain oder Collagenase durch jeweils 15 oder 30 min Verdau bei 37°C.

Direkt nach der Isolation ergaben sich mittels Trypanblaufärbung folgende Vitalitäten:

Collagenase	30 min Verdau:	$58,5 \pm 7,6 \%$
Papain	30 min Verdau:	$82,7 \pm 10,8 \%$
	15 min Verdau:	$90,5 \pm 0,4 \%$
Mechanisch	15 min Dauer:	$95,0 \pm 1,2 \%$
	30 min Dauer:	$97,0 \pm 3,0 \%$

(Mittelwerte aus zwei Präparationen mit jeweils zwei Ansätzen \pm Standardabweichung).

Zusätzlich wurden für 15 und 30 min mechanisch und mittels Papain isolierte Hepatozyten mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro cm² auf Laminin ausgesät. Nach 2 DIV erfolgte die Ablösung aller Zellen mit 0,25 % Trypsinlösung für 20 min. Die Vitalitäten der Hepatozyten wurden ebenfalls mit Trypanblaufärbung bestimmt:

Mechanisch	15 min Verdau:	$96,8 \pm 5,2 \%$
	30 min Verdau:	$97,7 \pm 2,3 \%$
Papain	15 min Verdau:	$87,0 \pm 6,0 \%$
	30 min Verdau:	$60,0 \pm 15,8 \%$

Es zeigt sich, daß für 30 min mechanisch isolierte Zellen höchste Vitalitäten aufwiesen und enzymatischer Verdau zu einer Reduktion der Vitalität führte, insbesondere durch Verdau mit Collagenase. Ebenfalls wiesen für 30 min mechanisch isolierte Zellen nach 2 Tagen in Kultur auf Laminin höhere Vitalitäten auf als für 15 min mechanisch isolierte Hepatozyten oder für 15 bzw. 30 min mit Papain enzymatisch isolierte Hepatozyten.

Alle folgenden Versuche wurden daher mit Hepatozyten durchgeführt, die für 30 min mechanisch isoliert wurden.

3.2 Zellzahlbestimmung

Zellzahlen von Hepatozyten in Kultur wurden nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur durch enzymatisches Ablösen aller Zellen mittels 1,25 % Trypsinlösung für 20 min und anschließendes Zählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Auf den Matrixproteinen Laminin, Collagen IV, Collagen I, Matrigel und Fibronectin sowie den feeder-Zellen 3T3, MRC-5 und primären Fibroblasten kultivierte Hepatozyten wurden mit Medienansätzen mit und ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Die Medien WE und DIF enthielten in allen Ansätzen Supplemente wie im Kapitel Material und Methoden angegeben.

Ohne Wachstumsfaktoren:

- A WE 5 % FCS 48 h → WE 0 % FCS
- B WE 5 % FCS 24 h → DIF 0% FCS
- C WE 5 % FCS 48 h → DIF 0% FCS
- D WE 5 % FCS

Um Hepatozyten unter definierten Bedingungen kultivieren zu können, wurde die Kultur im serumfreien Medium angestrebt. Nachdem Zellzahlbestimmungen beste Ergebnisse in Kultur mit Ansatz B ergaben, wurden zwecks Erhöhung der bislang relativ geringen Zellvermehrung die Kultur mit Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination supplementiert.

Mit Wachstumsfaktoren:

WE 5 % FCS 24 h → DIF 0% FCS und Zusatz von

- 1 Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren
- 2 HGF (20 ng*ml⁻¹)
- 3 EGF (20 ng*ml⁻¹)
- 4 TGFα (20 ng*ml⁻¹)
- 5 TPO (10 ng*ml⁻¹)
- 6 TPO (20 ng*ml⁻¹)
- 7 HGF (20 ng*ml⁻¹), EGF (20 ng*ml⁻¹)
- 8 HGF (20 ng*ml⁻¹), EGF (20 ng*ml⁻¹), TPO (10 ng*ml⁻¹)
- 9 HGF (20 ng*ml⁻¹), EGF (20 ng*ml⁻¹), TPO (20 ng*ml⁻¹)
- 10 HGF (20 ng*ml⁻¹), EGF (20 ng*ml⁻¹), TGFα (20 ng*ml⁻¹)
- 11 TPO (20 ng*ml⁻¹), TGFα (20 ng*ml⁻¹)
- 12 TPO (20 ng*ml⁻¹), HGF (20 ng*ml⁻¹)

3.2.1 Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz

Die Vermehrung embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren (Abb. 3.1 - Abb. 3.7) in serumfreien Medienansätzen (A, B, C) erwies sich sowohl auf Matrixproteinen als auch auf feeder-Zellen am höchsten in Kultur mit Mediumansatz B. Mit Ausnahme von Kulturen auf Collagen IV (Abb. 3.2) traf diese Beobachtung auch auf Ansatz D zu, d.h. höchste Zellvermehrungen wurden erreicht (mit Ausnahme auf Collagen IV) durch Kultur für 24 h in WE 5 % FCS, danach Wechsel auf serumfreies DIF. Nach 5 DIV (bis auf Kulturen mit 3T3 feeder-Zellen) wurden maximale Zellzahlen erreicht, die nach 12 DIV nicht höher als nach 5 DIV waren.

In Kultur auf Matrixproteinen kam es bis auf Ansätzen in Collagen IV in Ansatz A, also nach 24 h in WE 5 % FCS Wechsel auf serumfreies WE, nicht zu einer Vermehrung der Zellen sondern im Gegenteil zu einer Abnahme der Zellzahl. Zellzahlen der Ansätze C (nach 48 h Kultur in WE 5 % FCS Wechsel auf serumfreies DIF) und D (ständige Kultur in WE 5 % FCS) waren etwa gleich hoch. Insgesamt wurden mit $80.729 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf Matrigel (Abb. 3.4) nach 5 DIV höchste Zellzahlen erreicht, d.h. ausgehend von ausgesäten $20.000 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ eine Vervierfachung der Zellzahl.

Durch den Einsatz von feeder-Zellen wurde die Anzahl der Hepatozyten im Verlauf des Kultivierungszeitraumes im Vergleich zu Kulturen auf Matrixproteinen deutlich erhöht. Insbesondere Kulturen auf 3T3 (Abb. 3.5), aber auch auf MRC-5 (Abb. 3.6) wiesen schon nach 2 DIV wesentlich höhere Hepatozytenzahlen auf als Matrixkulturen. Kulturen auf 3T3 ergaben mit $411.198 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ nach 12 DIV höchste Zellzahlen überhaupt, es kommt somit zu einer zwanzigfach höheren Zellzahl als zu Beginn der Aussaat. Kulturen auf MRC-5 zeigten eine über 6fach höhere Zellzahl nach 5 DIV ($129.514 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$), auf primären Fibroblasten (Abb. 3.7) eine nahezu 5fache ($93.490 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$).

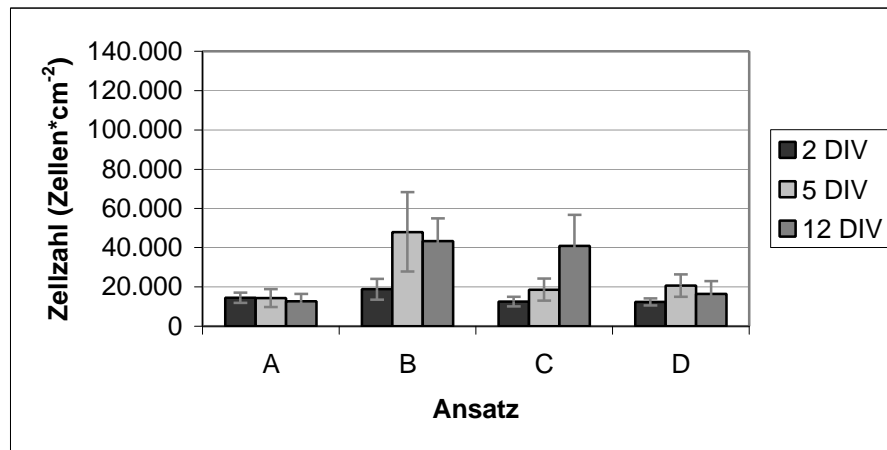


Abb. 3.1 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Laminin nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

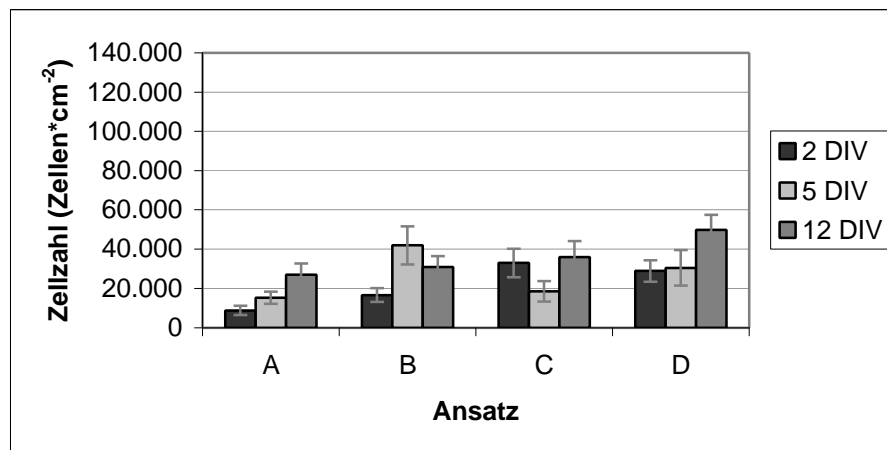


Abb. 3.2 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen IV nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

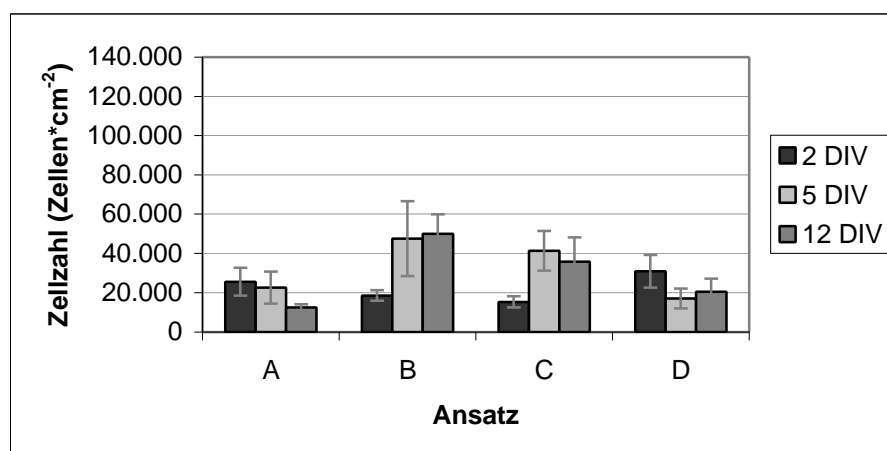


Abb. 3.3 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen I nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

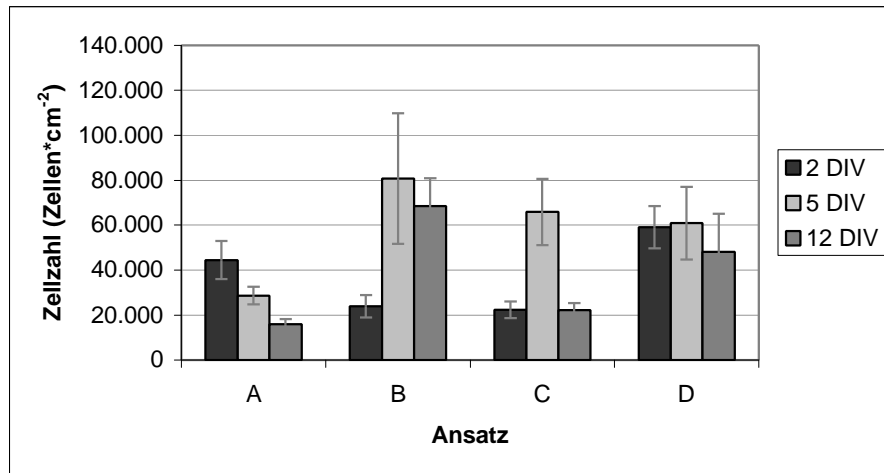


Abb. 3.4 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Matrigel nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

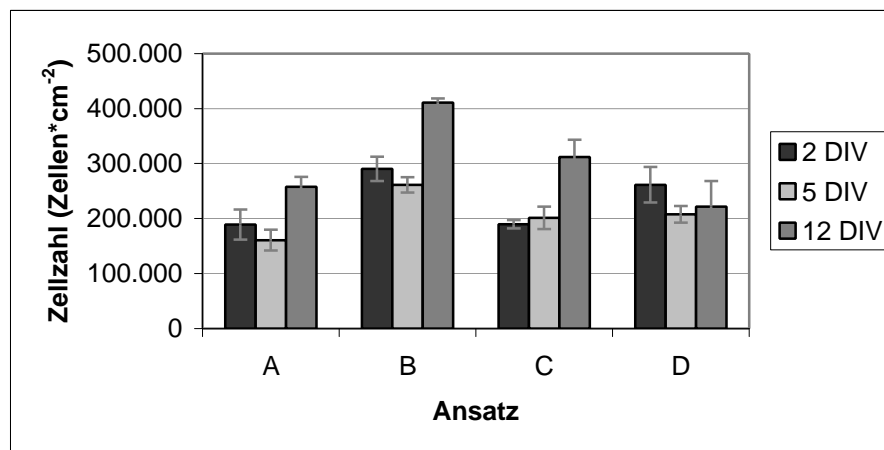


Abb. 3.5 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf 3T3 feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

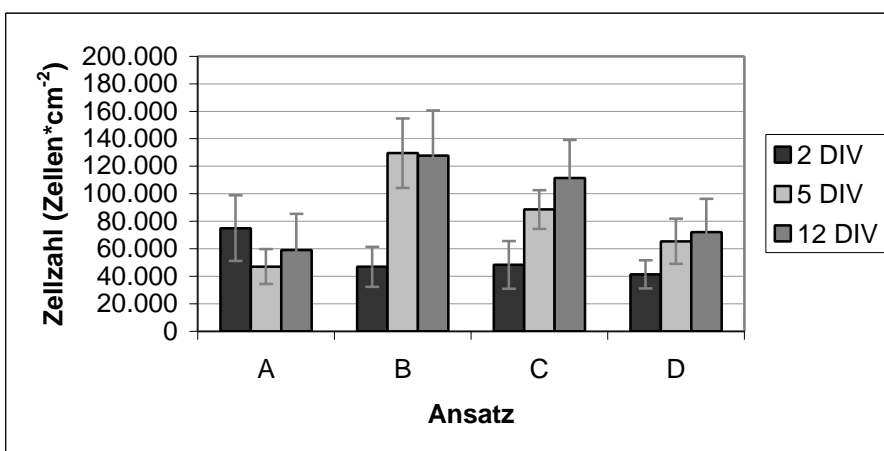


Abb. 3.6 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

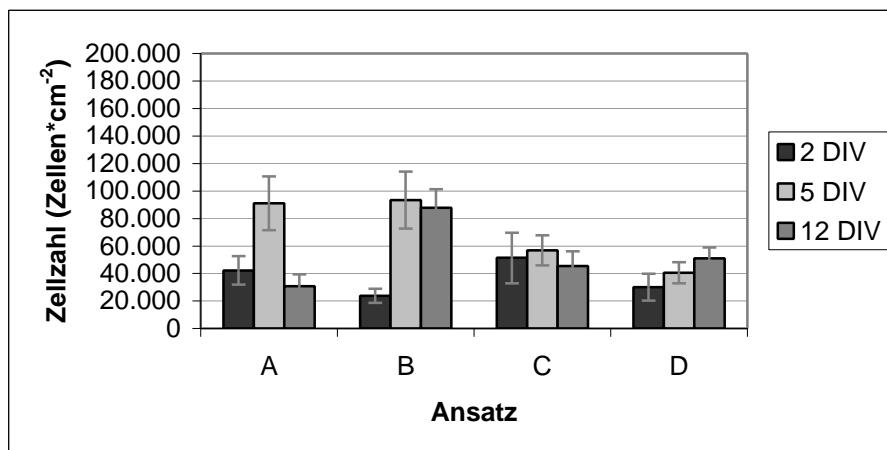


Abb. 3.7 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten als feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

3.2.2 Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz

Durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination konnten die Zellzahlen der Hepatozyten im Vergleich zu entsprechenden Ansätzen ohne Wachstumsfaktoren deutlich erhöht werden.

Im Vergleich der einzelnen Medienansätze mit Wachstumsfaktoren zeigte sich, daß Kulturen auf Laminin, Collagen IV und Matrigel maximale Zellzahlen durch den Zusatz von Thrombopoietin (TPO) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Konzentrationen von jeweils 20 ng*ml^{-1} aufwiesen, Kulturen auf den feeder-Zellen 3T3, MRC-5, primären Fibroblasten und Collagen I dagegen durch den Zusatz von TPO (20 ng*ml^{-1}) allein.

Generell wurden maximalste Zellzahlen in Kultur auf 3T3 feeder-Zellen erreicht, Zusatz von TPO führte zu einer über 30fach höheren ($616.406 \text{ Zellen*cm}^{-2}$) Zellzahl nach 12 DIV als zu Beginn der Kultur. In Kultur auf feeder-Zellen war im Gegensatz zu der auf Matrixproteinen die Zellzahl nach 2 DIV deutlich höher, ebenso führte der Zusatz von Wachstumsfaktoren auf feeder-Zellkultur zu einer weitaus geringeren Steigerung der Zellzahl in Bezug auf Kontrollansätze (Ansatz 1) ohne Wachstumsfaktoren als dies im Kultur auf Matrixproteinen der Fall ist.

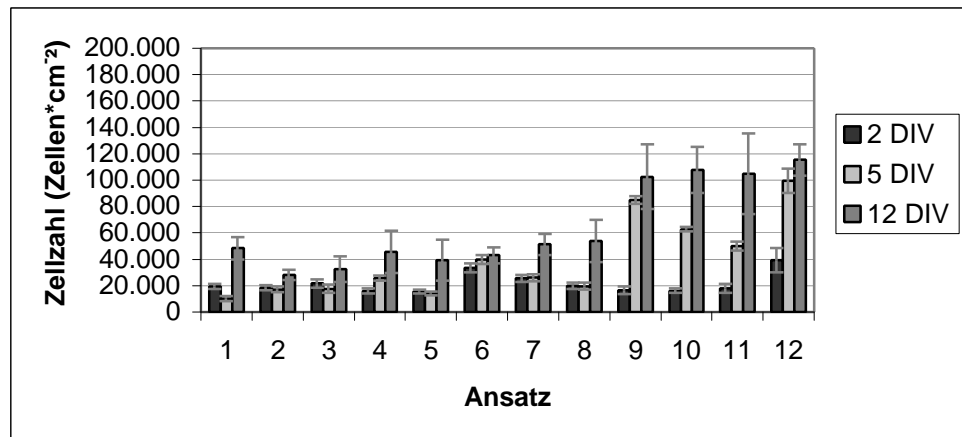


Abb. 3.8 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Laminin nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

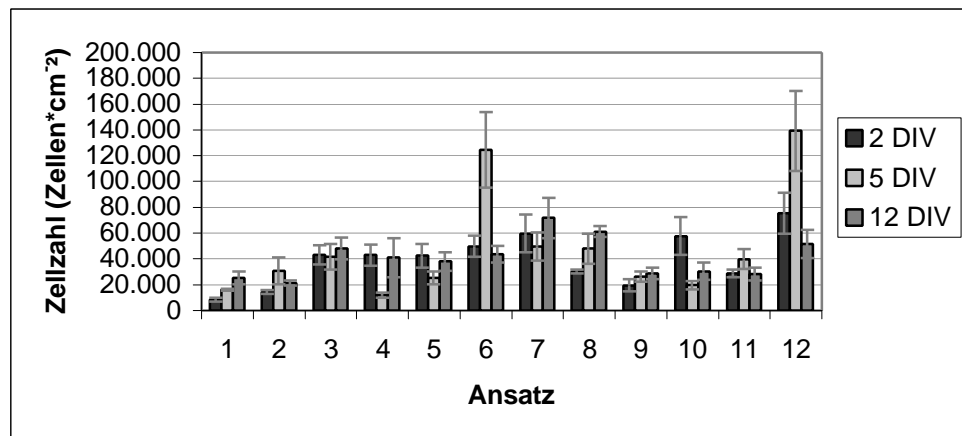


Abb. 3.9 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen IV nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

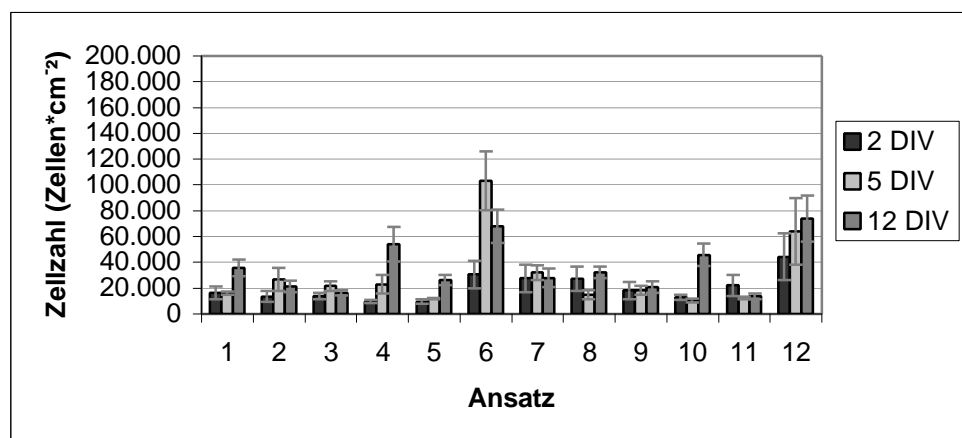


Abb. 3.10 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen I nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

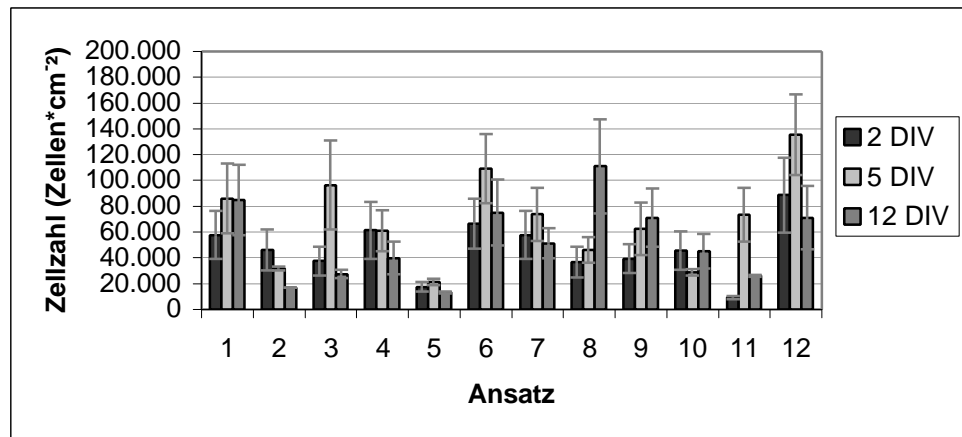


Abb. 3.11 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Matrigel nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

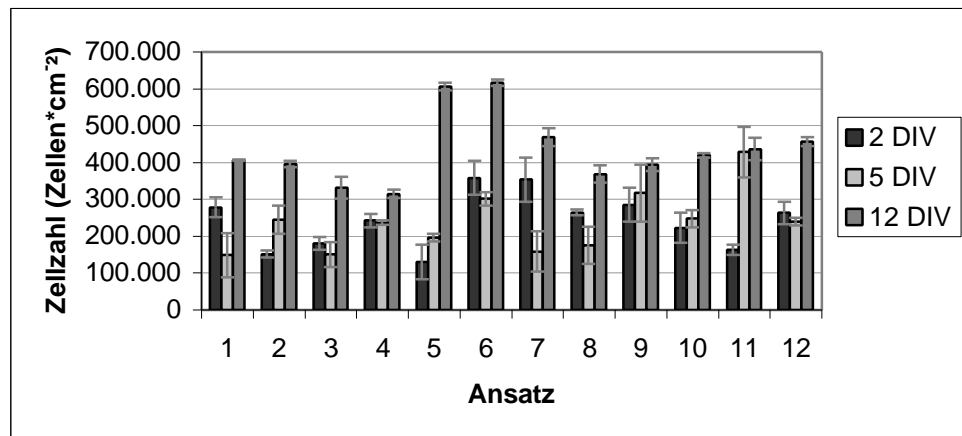


Abb. 3.12 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf 3T3 feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

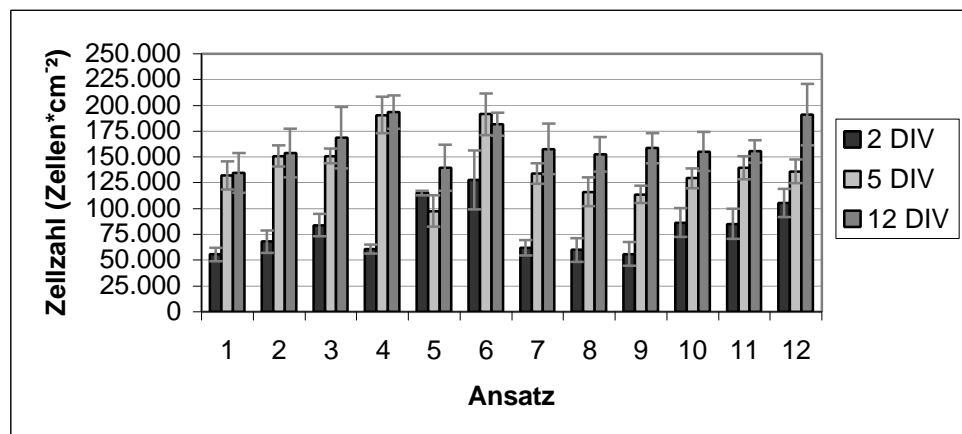


Abb. 3.13 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

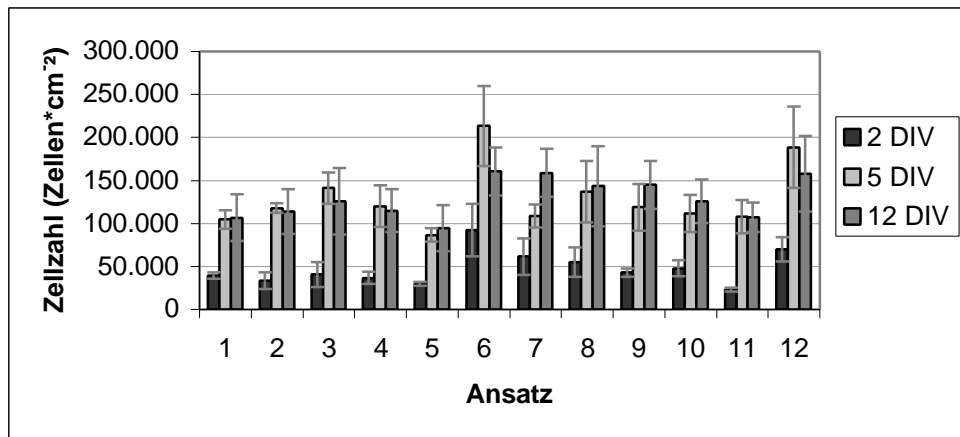


Abb. 3.14 Zellzahlbestimmung embryonaler Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit Medienansätzen 1 – 12 mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit je 4 Wiederholungen \pm SEM.

3.3 Albuminkonzentration

Das in das Medium abgegebene Albumin wurde aus gesammelten Zellkulturüberständen ermittelt und kumulativ graphisch dargestellt. Kulturen auf Laminin, Collagen IV, I, Matrigel, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten wurden in Medien Ansätzen A-D ohne Wachstumsfaktoren sowie in Medium mit Zusatz von optimalen Wachstumsfaktoren (siehe 3.2.2) bis zu 30 DIV kultiviert. Dazu erhielten Hepatozyten auf Laminin, Collagen IV und Matrigel (nach 1 DIV serumhaltiger Kultur in WE mit 5% FCS) ab dem zweiten Tag in Kultur einen Zusatz von je 20 ng/ml Thrombopoietin (TPO) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) in DIF serumfrei, Hepatozyten auf Collagen I, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten einen Zusatz von 20 ng/ml Thrombopoietin.

Die jeweiligen Albuminkonzentrationen wurden mit Hilfe eines direkten ELISA mit einer linearen Eichgerade im Bereich von 0-100 ng/ml ermittelt:

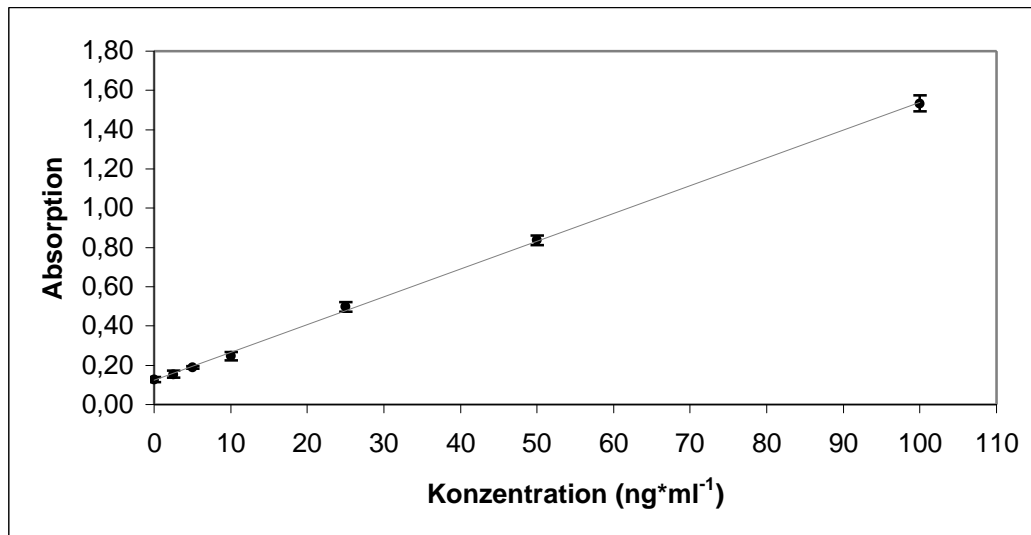


Abb. 3.15 Eichgerade Albumin. Exemplarische lineare Eichgerade von Albumin der Ratte. Mittelwerte aus 8 Meßpunkten \pm SEM.

Medien wurden als Blanks gemessen und detektierte Albuminkonzentrationen subtrahiert. Obwohl ein spezifischer Antikörper gegen Albumin der Ratte eingesetzt wurde, konnten geringe Kreuzreaktionen mit Rinderalbumin aus dem Medium bzw. Serum festgestellt werden. Durch simultane Messung der Albuminkonzentrationen vom jeweiligen eingesetzten Medium im unbenutzten Zustand (blank) und von Hepatozyten metabolisiert (Probe) konnte die Differenz und somit die nur von den Hepatozyten gebildete Albuminmenge bestimmt werden.

In serumfreien WE ist kein Albumin vorhanden, wohingegen mit 5% FCS supplementiertes WE sowie serumfreies DIF Rinderserumalbumin enthält.

Die Angaben der Albuminkonzentrationen erfolgt in Menge pro Fläche ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Es müssen daher bei der Beurteilung sekretierter Albuminmengen die Anzahlen der sich auf verschiedenen Oberflächen unterschiedlich stark vermehrten Hepatozyten berücksichtigt werden. Da nicht zu jedem Zeitpunkt in Kultur die Zellzahl bestimmt werden konnte, muß der generelle Trend der Vermehrung mit in die Beurteilung von produziertem Albumin pro Hepatozyt mit einfließen.

3.3.1 Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz

Generell zeigte sich, daß in der Kultur ohne Wachstumsfaktoren (Abb. 3.16 bis Abb. 3.22) sowohl auf Matrices als auch auf feeder-Zellen bei serum- und

albuminfreier Kultur in WE (Ansatz A: 48 h Kultur in WE 5% FCS, danach serumfreie Kultur in WE) höchste Albuminsekretionen pro Fläche nachzuweisen waren, nach 30 Tagen in Kultur etwa insgesamt zwei- bis dreimal mehr als in albuminhaltiger Kultur in WE (serumhaltig) oder in DIF (serumfrei). Nur in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen (Abb. 3.20) waren geringste Albuminsekretionen in Ansatz A, höchste in Ansatz B zu beobachten.

Dabei zeigten die Kulturen auf Matrices keine relevanten Unterschiede in der Albuminproduktion zwischen serumfreier Kultur in DIF oder serumhaltiger Kultur in WE. Kulturen in WE serumfrei (Ansatz A) zeigten auf Collagen I (Abb. 3.18) höchste Albuminsekretion ($7,01 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), in WE serumhaltig (Ansatz D) und DIF serumfrei (Ansätze B und C) wurde in Kultur auf Collagen IV (Abb. 3.17) am meisten Albumin produziert (D: $3,45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; B: $3,76 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; C: $2,56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen zeigten keine höheren Albuminsekretionen als auf Matrices (Ansatz A: $6,81 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), Kulturen auf primären Fibroblasten (Ansatz A: $49,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) und MRC-5 feeder-Zellen (Ansatz B: $106,56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; Ansatz A: $13,08 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) produzierten dagegen deutlich mehr Albumin.

3.3.2 Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz

Hepatozyten in Kultur mit optimalen Wachstumsfaktoren auf Matrixproteinen (Abb. 3.23) zeigten eine von der Matrix abhängige Konzentration an gebildetem Albumin. Kulturen auf Laminin produzierten mehr als doppelt soviel Albumin ($6,74 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) wie Kulturen auf Matrigel ($2,75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) oder Collagen IV ($3,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) über einen Zeitraum von 30 Tagen in Kultur. Hepatozyten auf Collagen I sekretierten insgesamt ebenso deutlich mehr Albumin ($5,49 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) in das Medium als Hepatozyten auf Matrigel oder Collagen IV.

Kulturen auf feeder-Zellen (Abb. 3.24) sekretierten deutlich mehr Albumin in das Medium als Kulturen auf Matrixproteinen. Dabei produzierten Hepatozyten auf MRC-5 ($12,59 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) weitaus größere Mengen als Hepatozyten auf primären Fibroblasten ($9,45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) oder 3T3 ($7,12 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), obwohl die Zellzahlen der Hepatozyten nach 5 DIV auf 3T3 ($616.406 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$) größer waren als die auf MRC-5 ($191.406 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$) oder primären Fibroblasten ($213.281 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$).

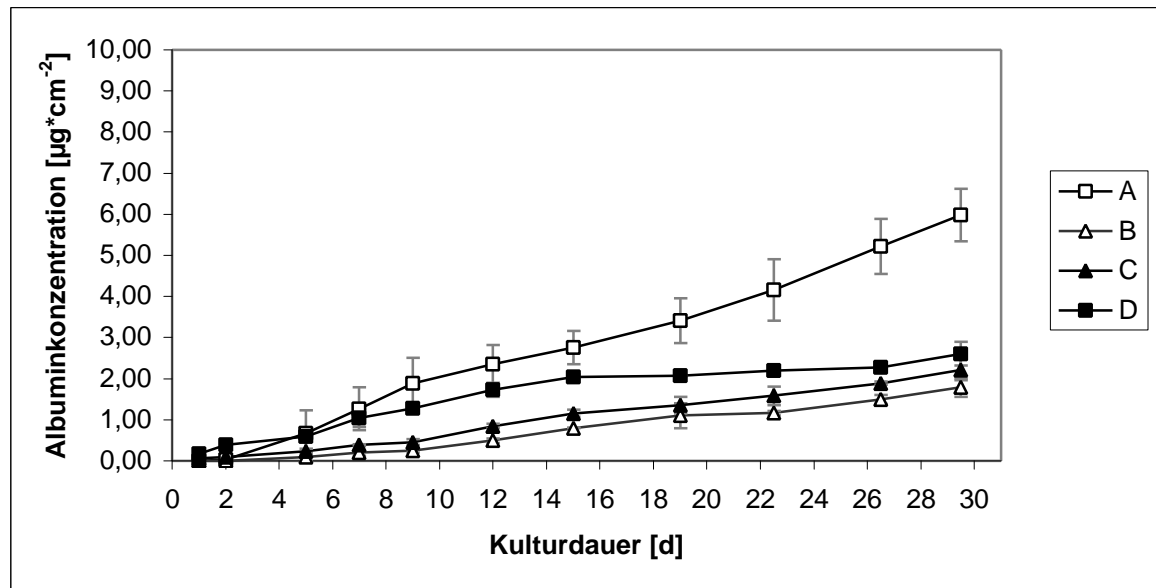


Abb. 3.16 Kumulative Albuminproduktion auf Laminin embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

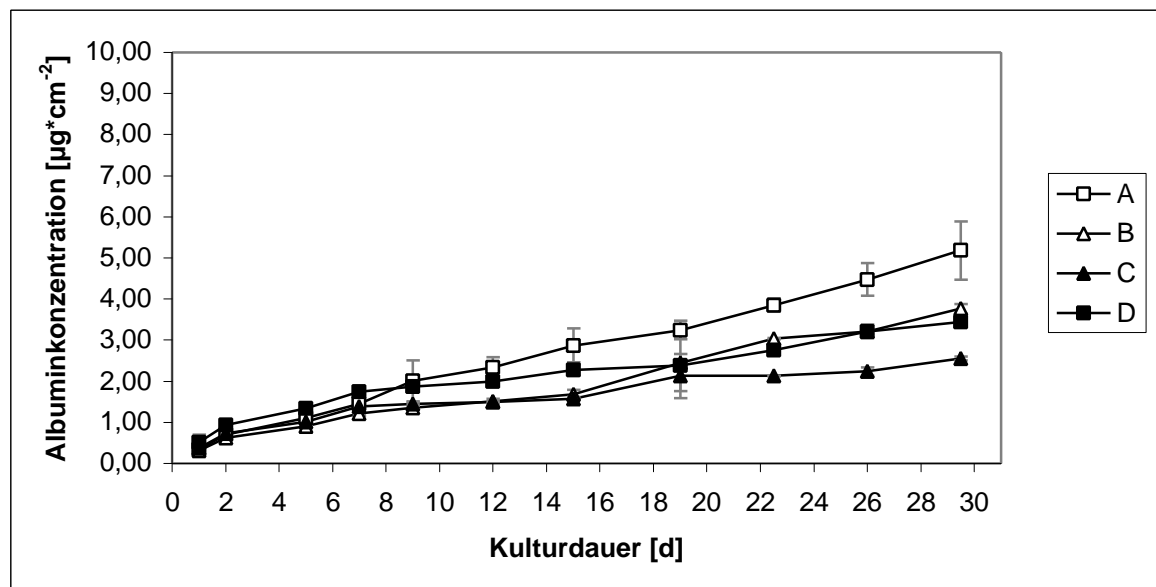


Abb. 3.17 Kumulative Albuminproduktion auf Collagen IV embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

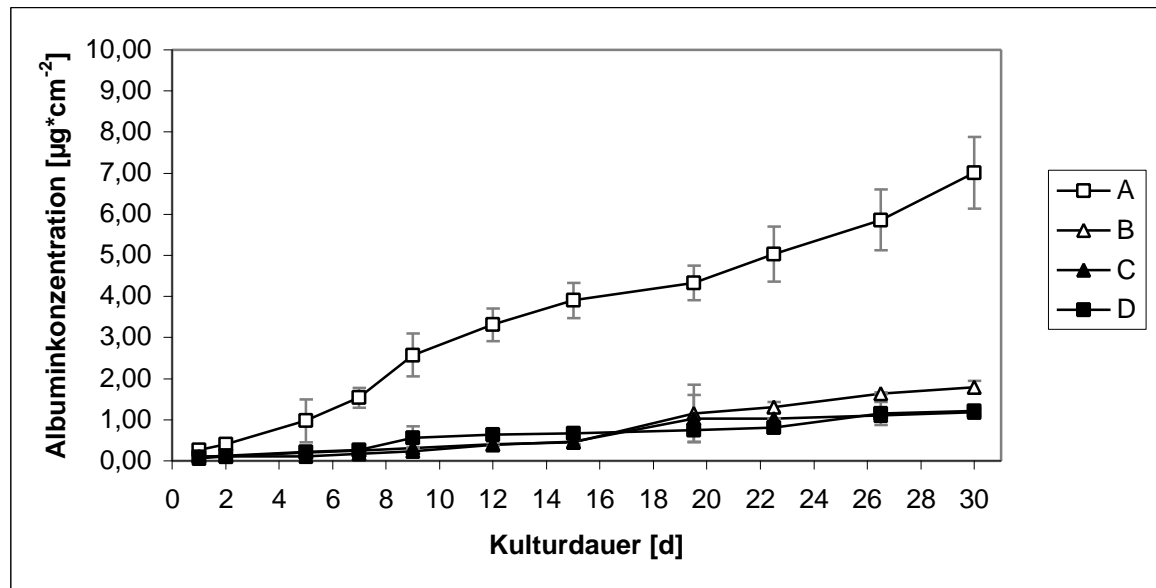


Abb. 3.18 Kumulative Albuminproduktion auf Collagen I embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

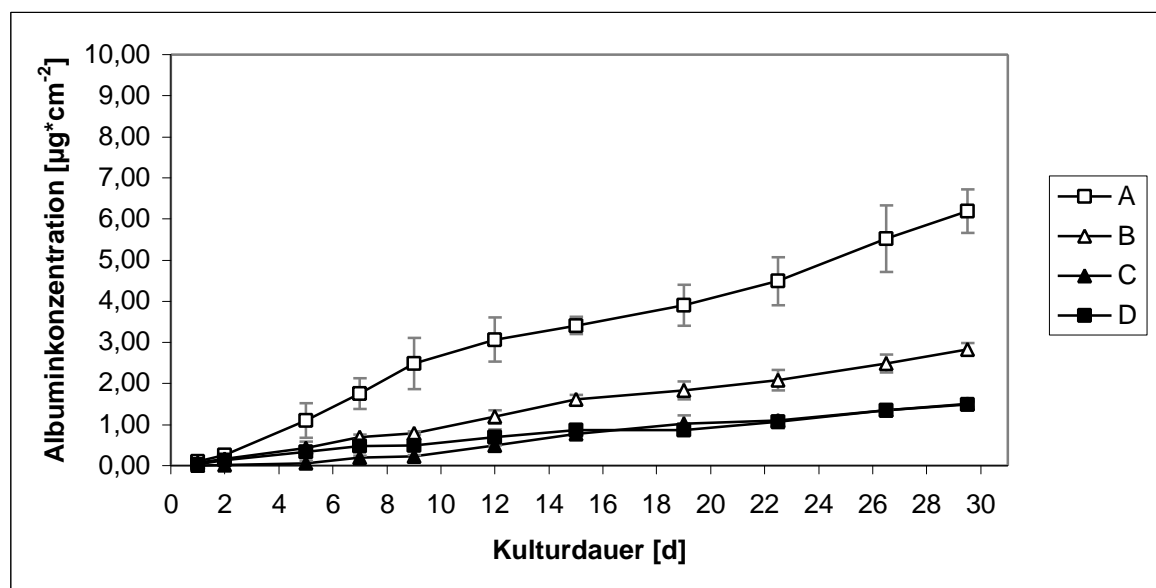


Abb. 3.19 Kumulative Albuminproduktion auf Matrigel embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

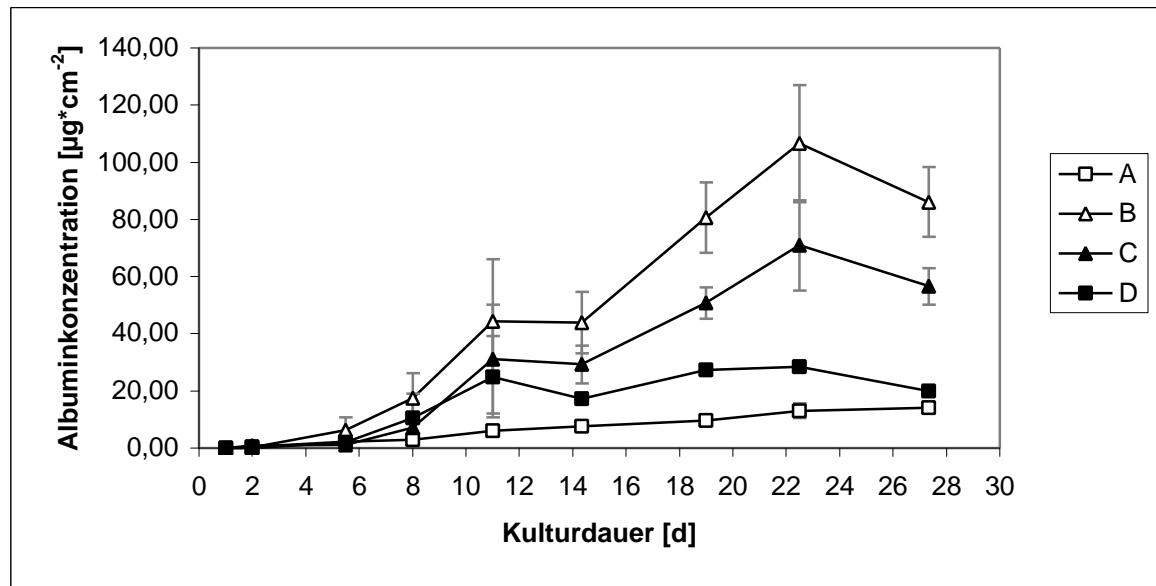


Abb. 3.20 Kumulative Albuminproduktion auf MRC-5 feeder-Zellen embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Albuminproduktion der feeder-Zellen wurde subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

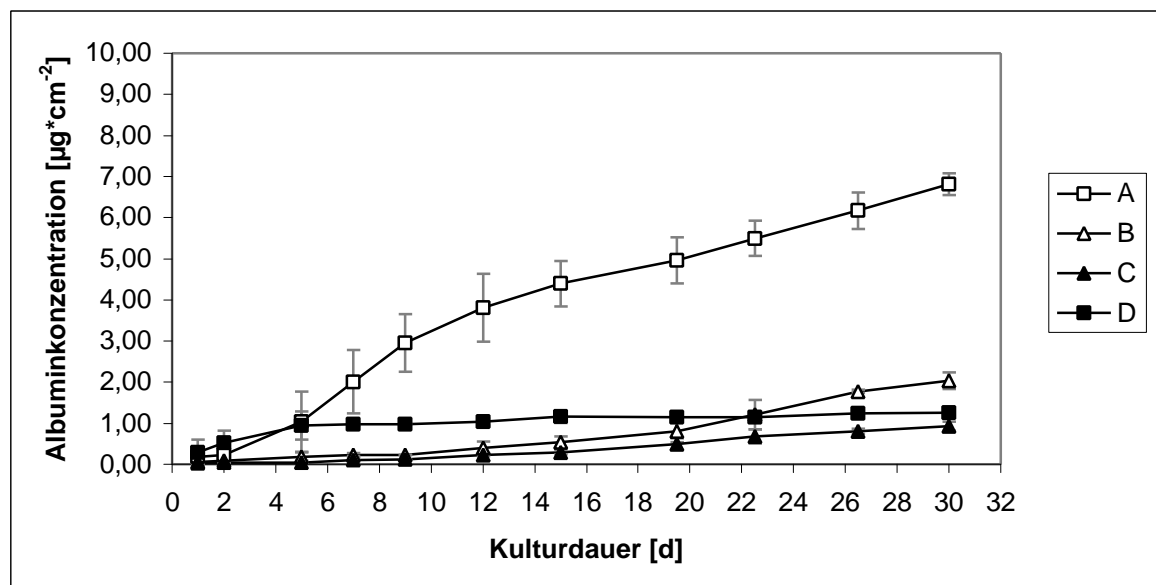


Abb. 3.21 Kumulative Albuminproduktion auf 3T3 feeder-Zellen embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Albuminproduktion der feeder-Zellen wurde subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

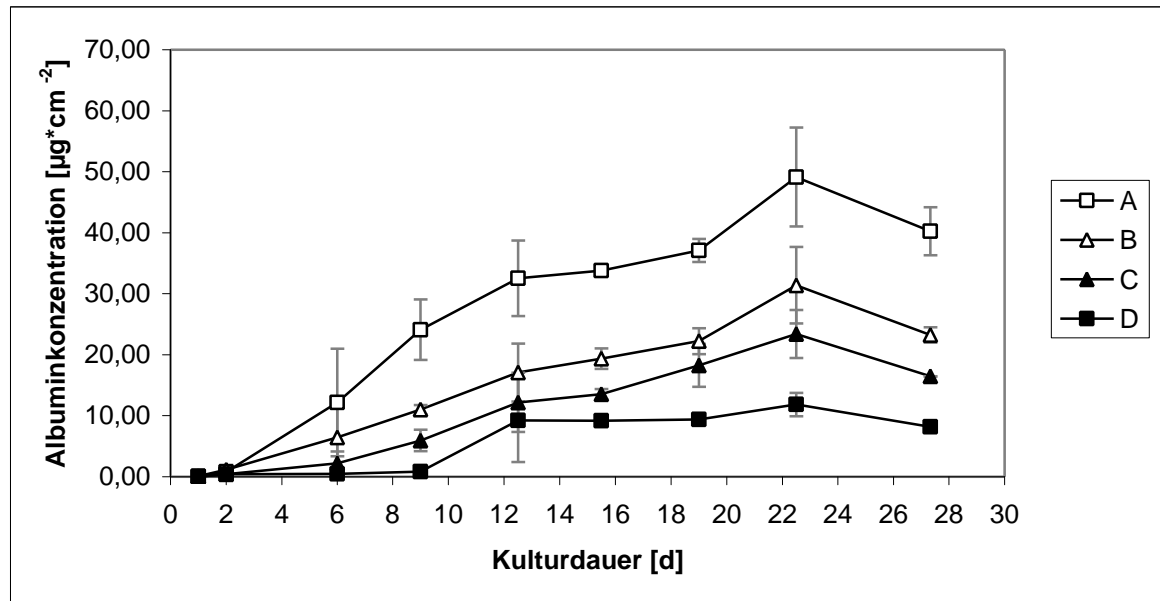


Abb. 3.22 Kumulative Albuminproduktion auf Fibroblasten feeder-Zellen embryonaler Hepatozyten in Kultur ohne Wachstumsfaktoren mit Medienansätzen A – D. Albuminproduktion der feeder-Zellen wurde subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

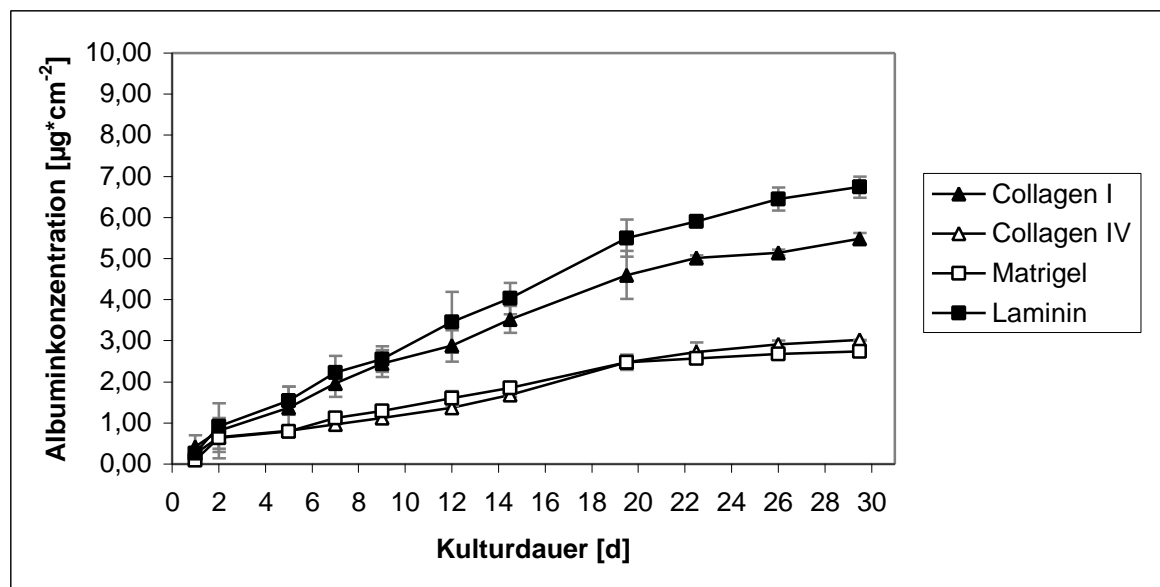


Abb. 3.23 Kumulative Albuminproduktion embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen I, IV, Matrigel und Laminin mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 6 Wiederholungen \pm SEM.

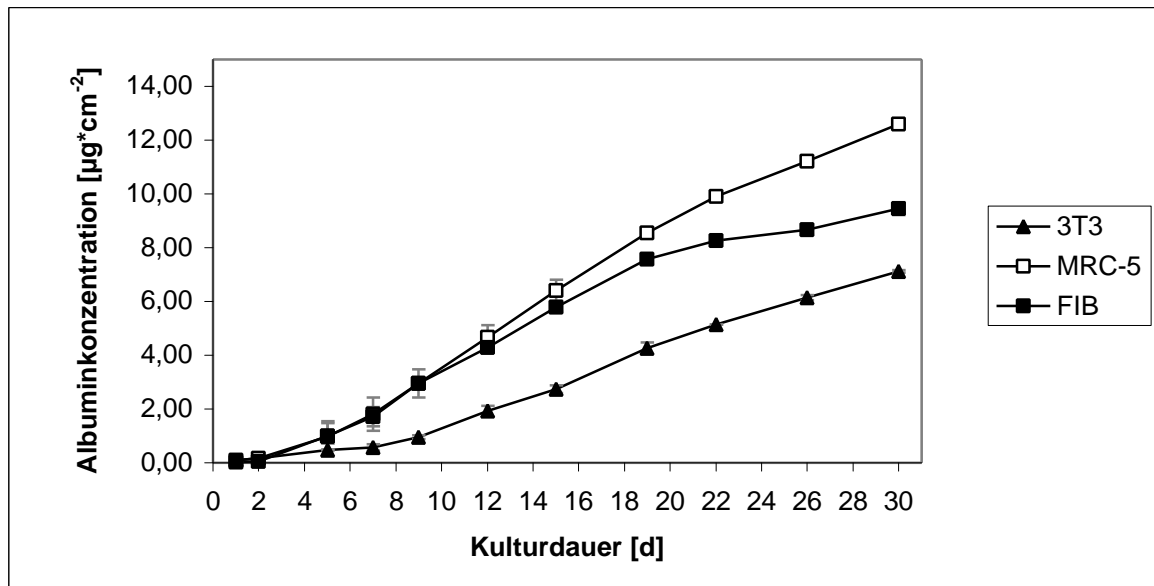


Abb. 3.24 Kumulative Albuminproduktion embryonaler Hepatozyten auf diversen feeder-Zellen mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 6 Wiederholungen \pm SEM.

3.4 Glukose- und Laktatbestimmung

Die in den Kulturüberständen vorliegenden Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen in Kultur bestimmt. Die vor der Kultur in den Medien befindlichen Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden von denen der gesammelten Überständen nach der Kultur subtrahiert und graphisch dargestellt, so daß der von den Hepatozyten erzeugte Netto-Umsatz verdeutlicht werden kann. Bei Kulturen auf feeder-Zellen wurden die in Kontrollansätzen (feeder-Zellen ohne Hepatozyten) umgesetzten Glukose- und Laktatkonzentrationen von denen der Hepatozyten subtrahiert.

Untersucht wurden Kulturen auf Laminin, Collagen IV, Collagen I, Matrigel, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten mit Medienansätzen A - D ohne Wachstumsfaktoren sowie Ansätze mit als optimal bestimmten Wachstumsfaktor bzw. -faktoren (siehe 3.2.2). Dazu erhielten Hepatozyten auf Laminin, Collagen IV und Matrigel (nach 1 DIV serumhaltiger Kultur in WE mit 5% FCS) ab dem zweiten Tag in Kultur einen Zusatz von je 20 ng/ml Thrombopoietin (TPO) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) in DIF serumfrei, Hepatozyten auf Collagen I, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten einen Zusatz von 20 ng/ml Thrombopoietin.

3.4.1 Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz

Kulturen auf allen Matrixproteinen zeigten unabhängig von der Art des Mediums eine relativ konstante Laktatsekretion von etwa $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über einen Zeitraum von 2 – 4 DIV bis zum Ende der Kultur nach 30 DIV (Abb. 3.26, Abb. 3.28, Abb. 3.30, Abb. 3.32). Der Umsatz von Glukose bei Kulturen auf Matrices (Abb. 3.25, Abb. 3.27, Abb. 3.29, Abb. 3.31) hing jedoch stark von der Art des Kulturmediums ab. Hepatozyten in Medienansätzen A und D (WE Medium, nach 48 h serumfrei [A] bzw. konstanter serumhaltiger Kultur [D]) verbrauchten spätestens nach 5 DIV Glukose, Hepatozyten in Medienansätzen B und C (DIF Medium serumfrei nach 24 [B] bzw. 48 h [C] serumhaltiger Kultur in WE) dagegen gaben Glukose in das Medium ab, betrieben also keine Glykolyse sondern Glukoneogenese. Dieser Effekt war bei allen Matrixkulturen, am deutlichsten aber bei Kulturen auf Collagen IV (Abb. 3.27) zu beobachten.

Hepatozyten in Kultur auf feeder-Zellen gaben unabhängig von der Art des Mediumansatzes keine Glukose in das Kulturmedium ab, vielmehr war bis zu 30 Tagen in Kultur Glukoseverbrauch zu beobachten (Abb. 3.33, Abb. 3.35, Abb. 3.37). Laktat wurde während des gesamten Zeitraumes in Kultur in das Medium sekretiert, wobei Kulturen auf primären Fibroblasten (Abb. 3.38) deutlich weniger Laktat in das Medium abgaben (mit etwa $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über einen Zeitraum von 2 – 4 DIV die gleiche Menge wie Kulturen auf Matrixproteinen) als Kulturen auf MRC-5 (Abb. 3.34) oder 3T3 (Abb. 3.36) feeder-Zellen (maximal $1,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bzw. $0,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über einen Zeitraum von 2 – 4 DIV). Einzig bei Kulturen auf MRC-5 und 3T3 feeder-Zellen war die Größe der Laktatsekretion abhängig von der Art des Mediums, nämlich am stärksten bei Medienansätzen mit DIF Medium. Dies wurde jedoch bedingt durch die größeren Zellzahlen bei Kulturen mit DIF.

3.4.2 Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz

Embryonale Hepatozyten in Kultur auf Matrixproteinen mit Zusatz von Wachstumsfaktoren im Medium zeigten unabhängig von der Art der Beschichtung in etwa gleich hohe Laktatsekretionen (Abb. 3.40) von 0,2 bis $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über einen Zeitraum von 2 – 4 DIV. Ebenso zeigte sich der Glukoseverbrauch (Abb.

3.39) von etwa 0,1 bis 0,4 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ über einen Zeitraum von 2 – 4 DIV unabhängig von der Beschichtungsmatrix konstant. Der generell zu beobachtende Glukoseverbrauch steht im Gegensatz zu Kulturen ohne Wachstumsfaktoren in DIF Medium auf Matrixproteinen, welche Glukose in das Medium abgaben.

Hepatozyten auf feeder-Zellen verbrauchten (bedingt auch durch die höheren Zellzahlen an Hepatozyten) mehr Glukose (Abb. 3.41) aus dem Medium und sekretierten mehr Laktat (Abb. 3.42) als Hepatozyten in Kultur auf Matrizes. Auffällig ist, daß Hepatozyten auf MRC-5 feeder-Zellen deutlich mehr Glukose verbrauchten bzw. Laktat sekretierten als Hepatozyten auf 3T3 feeder-Zellen oder primären Fibroblasten, obwohl nach 5 DIV mehr als doppelt soviel Hepatozyten auf 3T3 feeder-Zellen ($616.406 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$) existierten als auf MRC-5 feeder-Zellen ($191.406 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$) oder primären Fibroblasten ($213.281 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$).

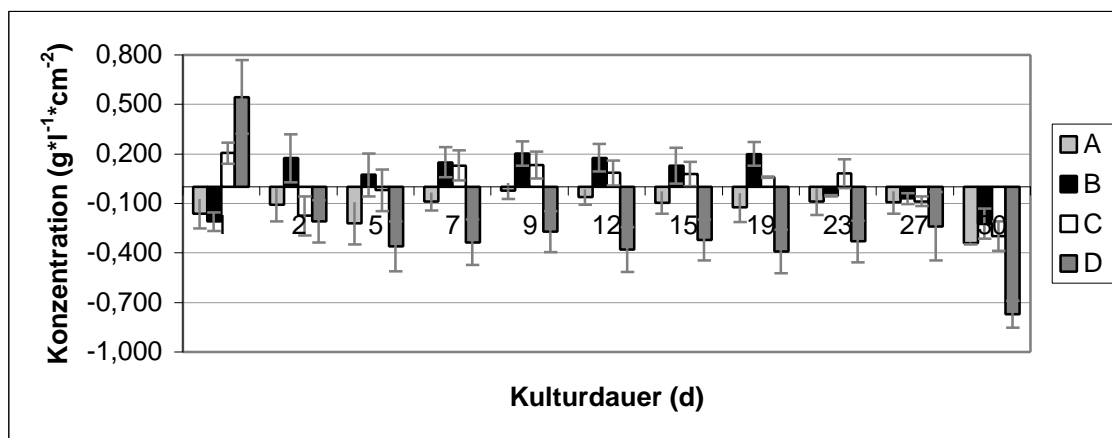


Abb. 3.25 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Laminin mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

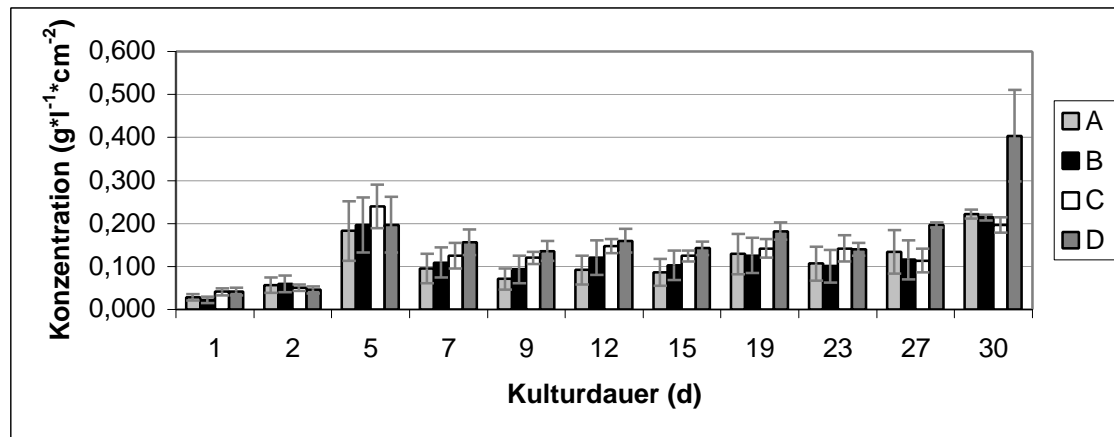


Abb. 3.26 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Laminin mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

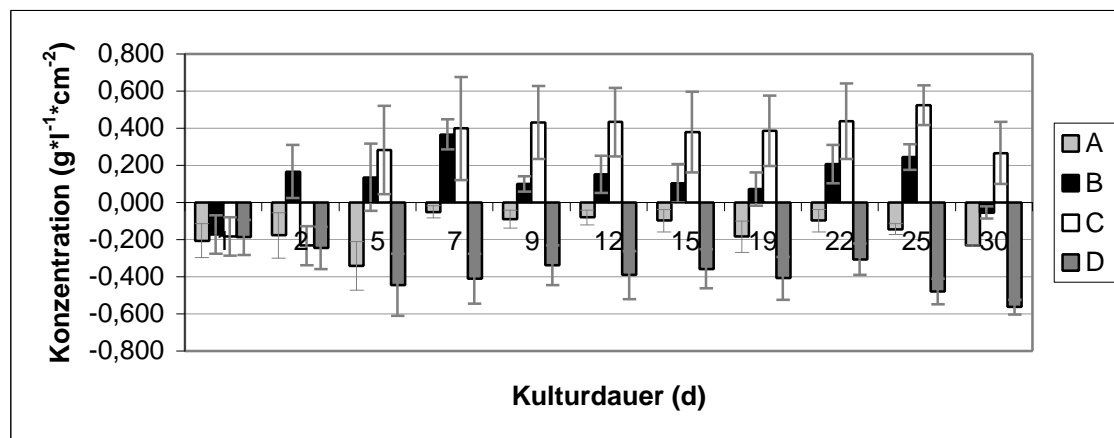


Abb. 3.27 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Collagen IV mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

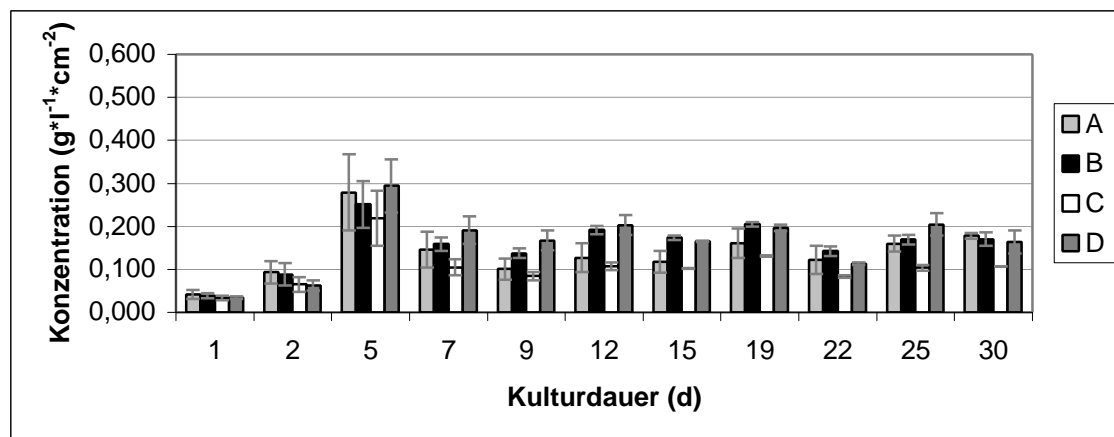


Abb. 3.28 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Collagen IV mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

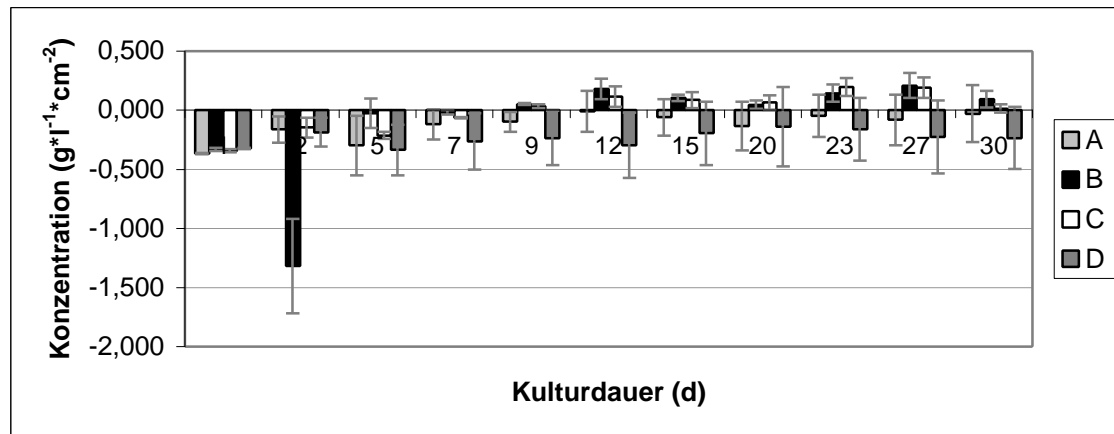


Abb. 3.29 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Collagen I mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

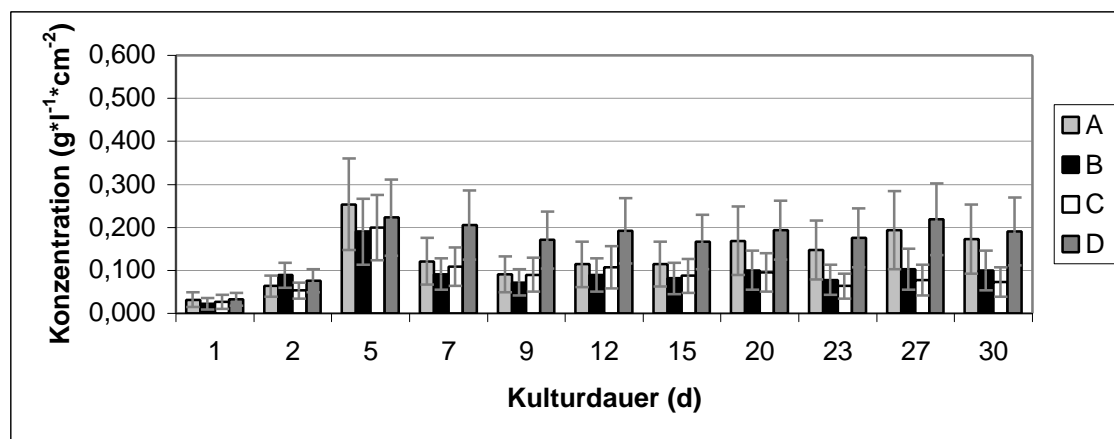


Abb. 3.30 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Collagen I mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

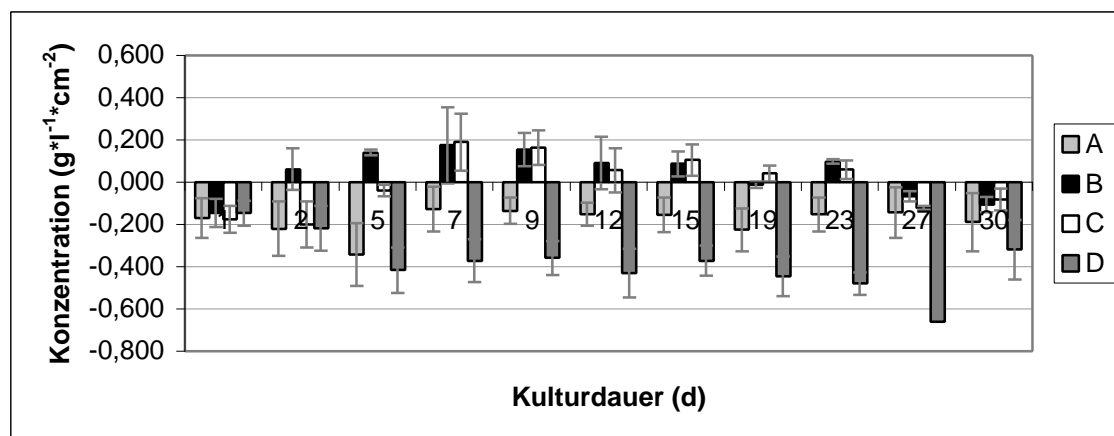


Abb. 3.31 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Matrigel mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

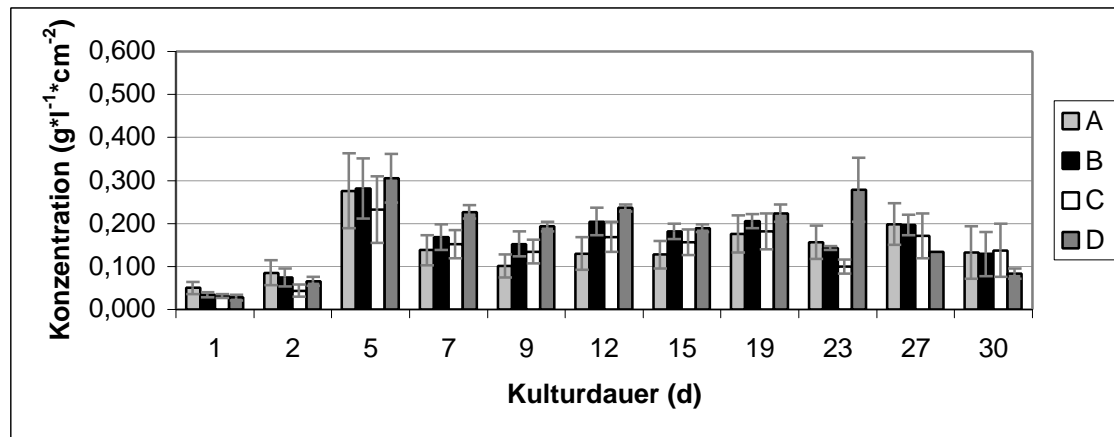


Abb. 3.32 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf Matrigel mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

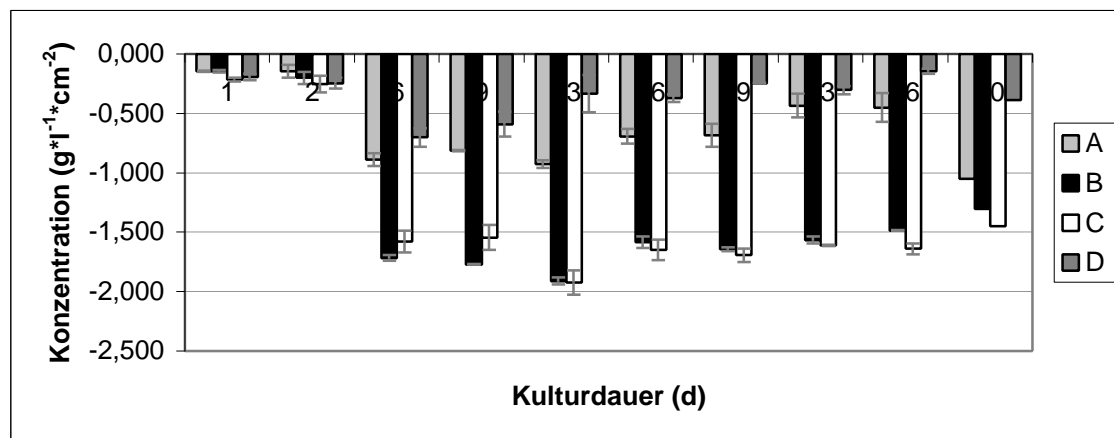


Abb. 3.33 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf MRC-5 mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

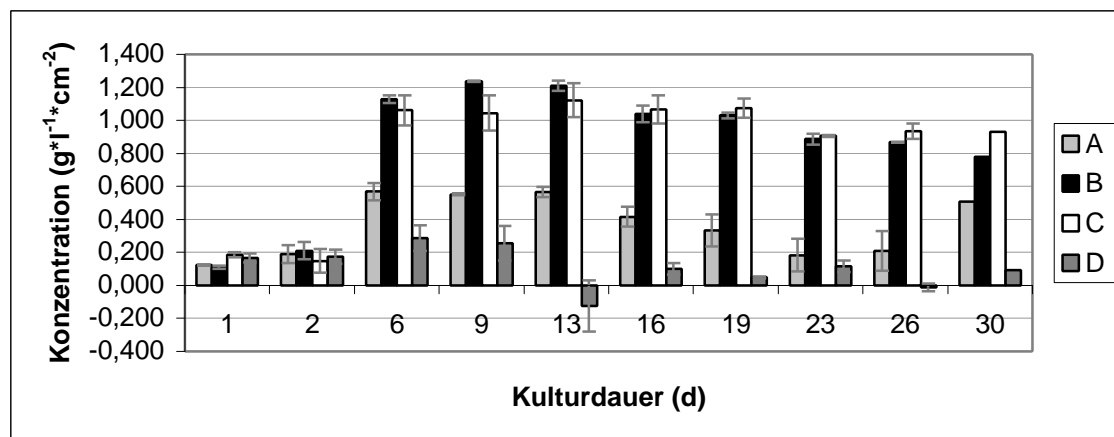


Abb. 3.34 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf MRC-5 mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

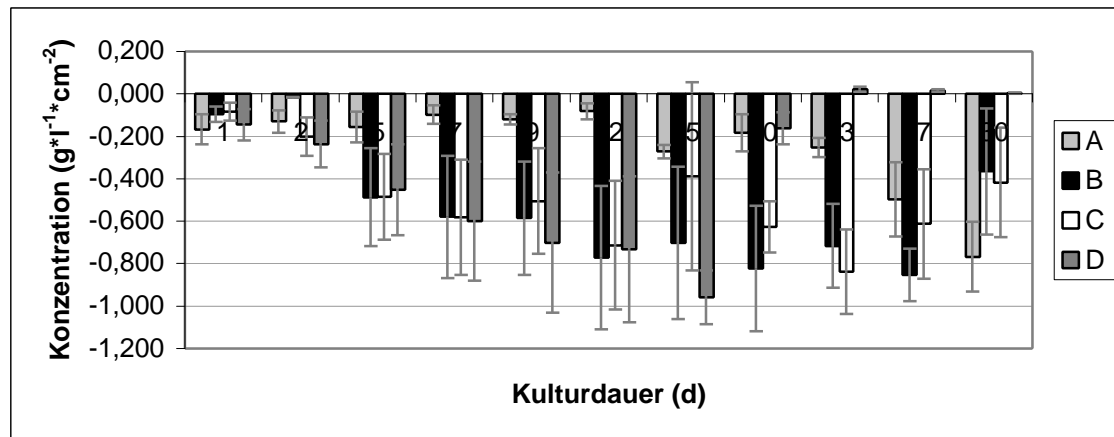


Abb. 3.35 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf 3T3 mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

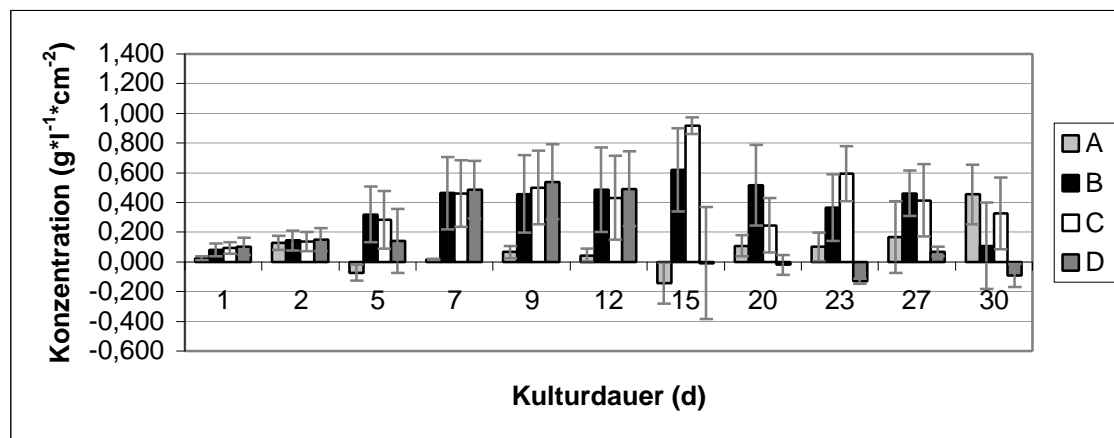


Abb. 3.36 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf 3T3 mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

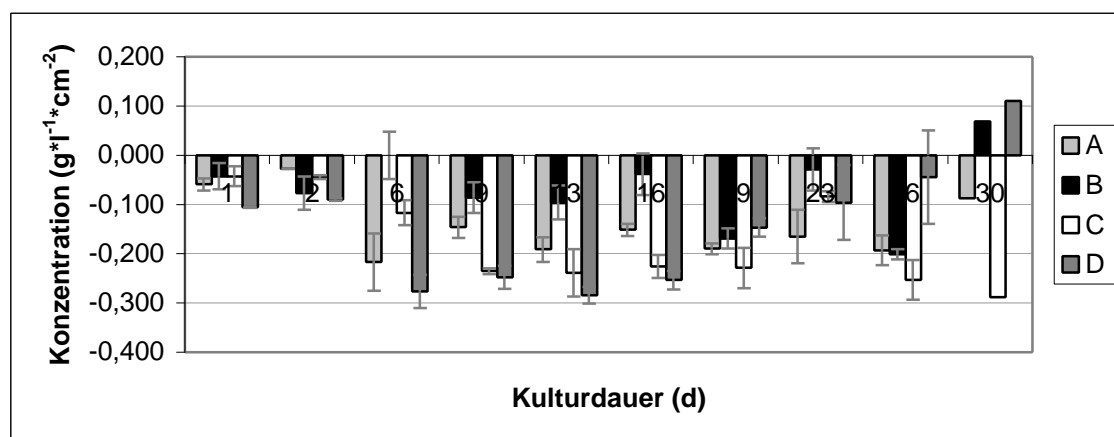


Abb. 3.37 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf primären Fibroblasten mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

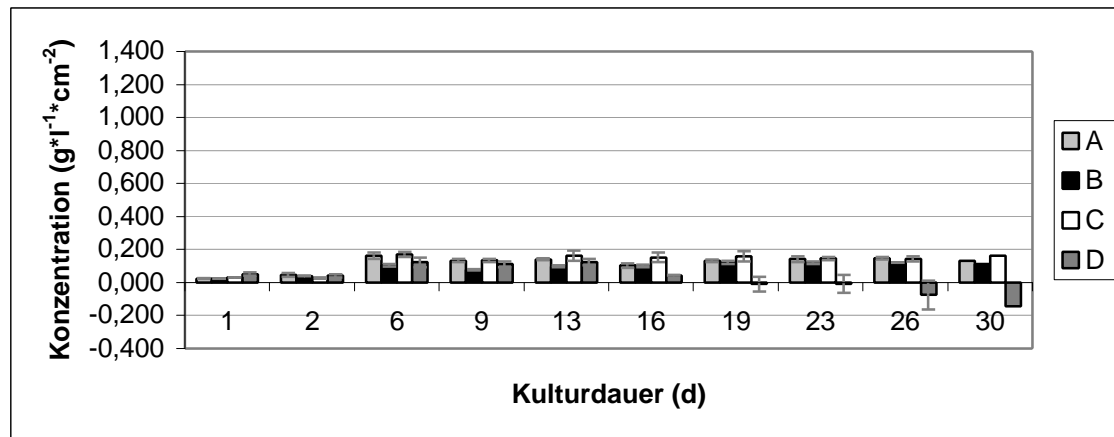


Abb. 3.38 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf primären Fibroblasten mit Medienansätzen A – D. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

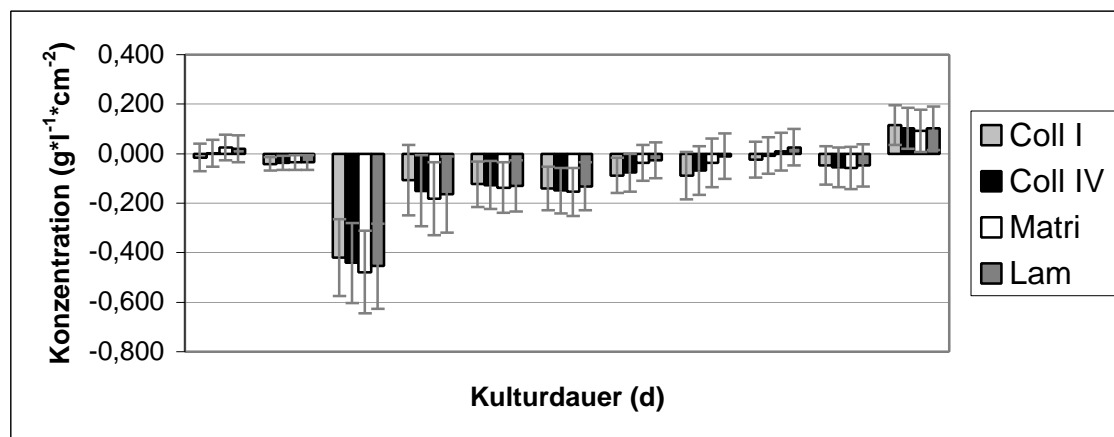


Abb. 3.39 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf verschiedenen Matrices mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

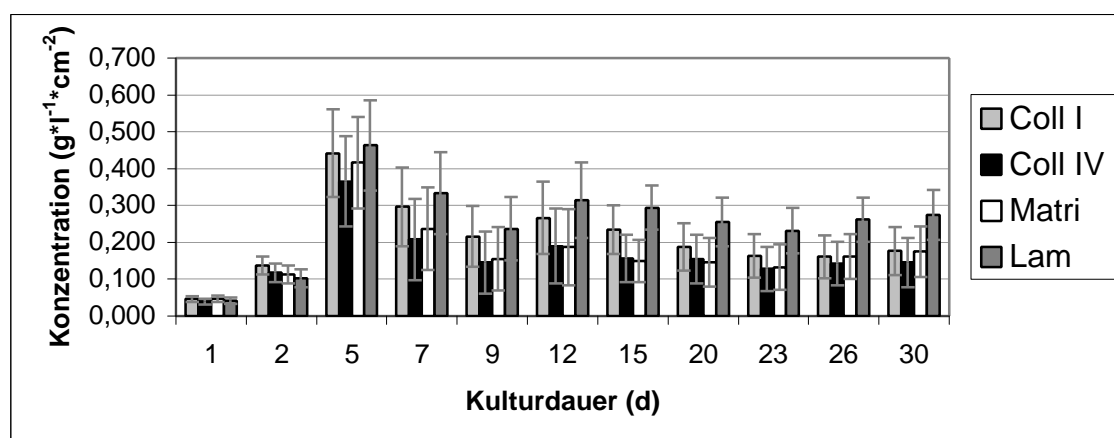


Abb. 3.40 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf verschiedenen Matrices mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

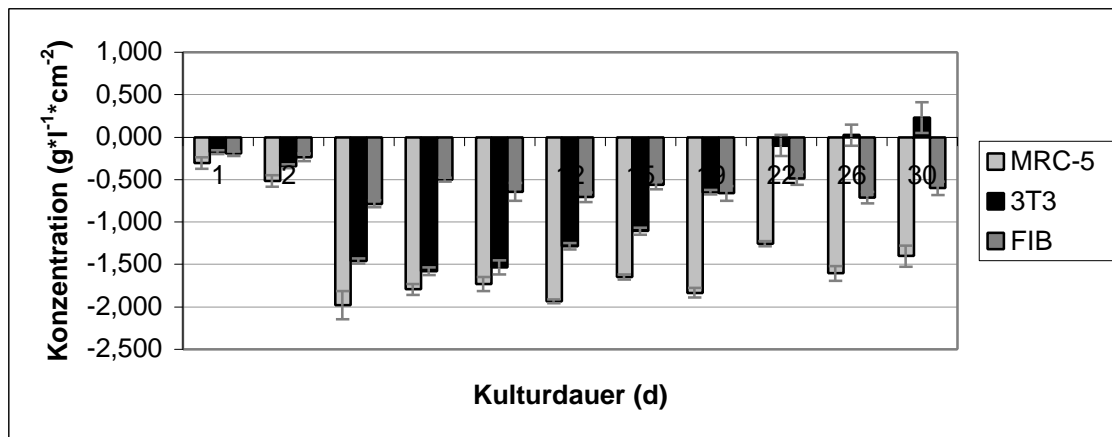


Abb. 3.41 Netto-Glukosekonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf verschiedenen feeder-Zellen mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

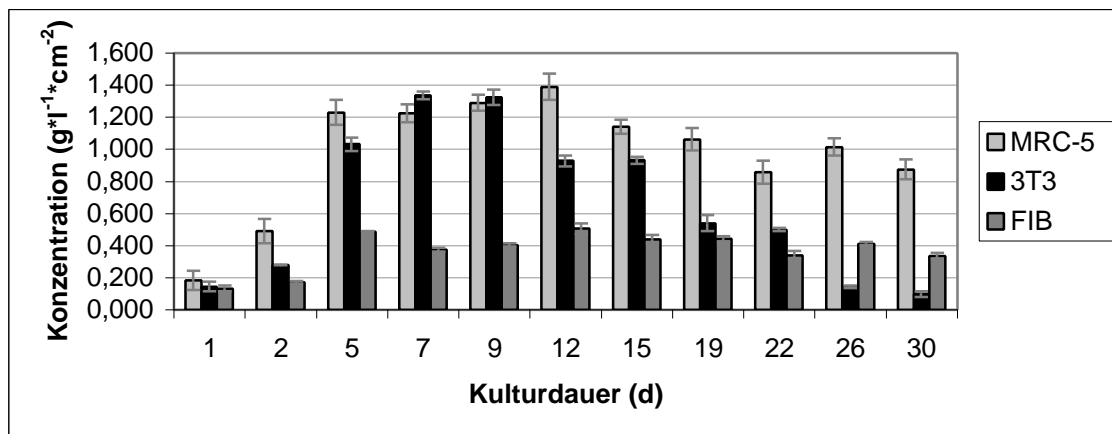


Abb. 3.42 Netto-Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen embryonaler Hepatozyten kultiviert auf verschiedenen feeder-Zellen mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit 3 bzw. 6 Wiederholungen \pm SEM.

3.5 Cytochrom-P450 Aktivität

Cytochrom-P450 (CYP) Aktivitäten wurden an embryonalen Hepatozyten in induzierter Kultur auf Matrixproteinen und feeder-Zellen nach 2, 5 und 12 DIV gemessen. In Medienansätzen ohne und mit jeweils optimalen Wachstumsfaktoren wurde die Cytochrom-P450 Aktivität bestimmt. Dazu erhielten Hepatozyten auf Laminin, Collagen IV und Matrigel (nach 1 DIV serumhaltiger Kultur in WE mit 5% FCS) ab dem zweiten Tag in Kultur einen Zusatz von je 20 ng/ml Thrombopoietin (TPO) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) in DIF

serumfrei, Hepatozyten auf Collagen I, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten einen Zusatz von 20 ng/ml Thrombopoietin.

Es wurden Ethoxyresorufin, Pentoxyresorufin und Ethoxycoumarin als Substrate in das Medium hinzugefügt, die von der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), 7-Pentoxyresorufin-O-depentylase (PROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) umgesetzt wurden, jeweils als Modellsubstrate für CYP1A1/2, 2B1/2 sowie 3A. Nach mindestens einer bis maximal drei Stunden wurde der direkte Substratumsatz durch Messung der jeweiligen gebildeten Produkte Resorufin bzw. Hydroxycoumarin im Mediumüberstand bestimmt. Durch den Zusatz von Arylsulfatase und beta-Glucuronidase zu den jeweiligen gesammelten Medienüberständen wurden evtl. durch Phase II Enzyme gebildete Konjugationen der Produkte aufgelöst. Kontrollansätze wurden ohne Zusatz von Substrat durchgeführt, bei Kulturen auf feeder-Zellen zusätzlich Kontrollen mit und ohne Substrat ohne Hepatozyten (nur feeder-Zellen).

Anhand einer parallel angelegten Eichreihe mit den Produkten Resorufin bzw. Hydroxycoumarin konnte die Menge des Substratumsatzes pro Zeit und Fläche ermittelt werden:

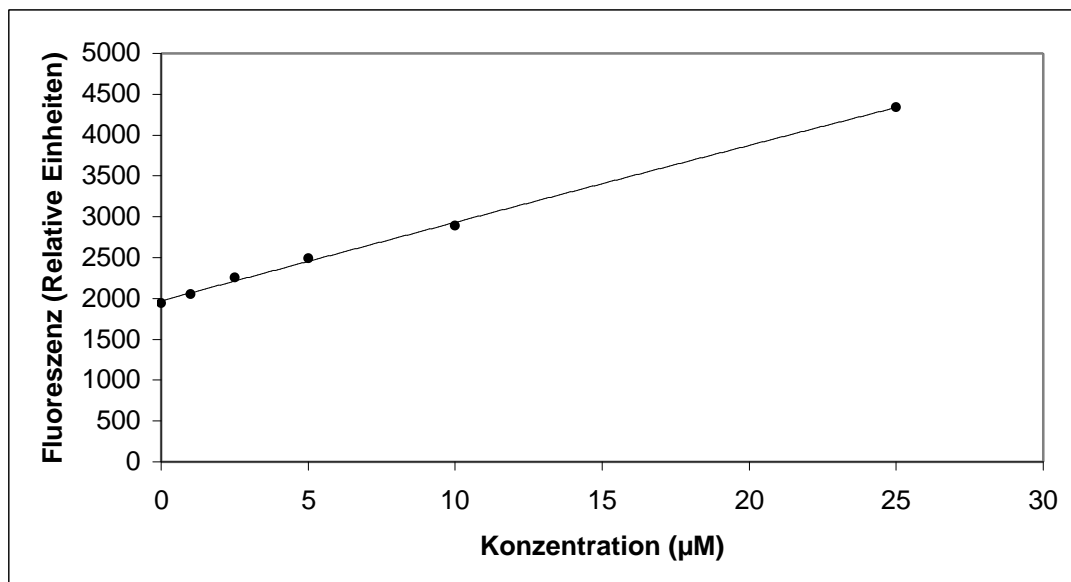


Abb. 3.43 Eichgerade Resorufin. Exemplarische lineare Eichgerade von Resorufin, dem Produkt der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Pentoxyresorufin-O-depentylase (PROD). Mittelwerte aus je 4 Meßpunkten \pm SEM.

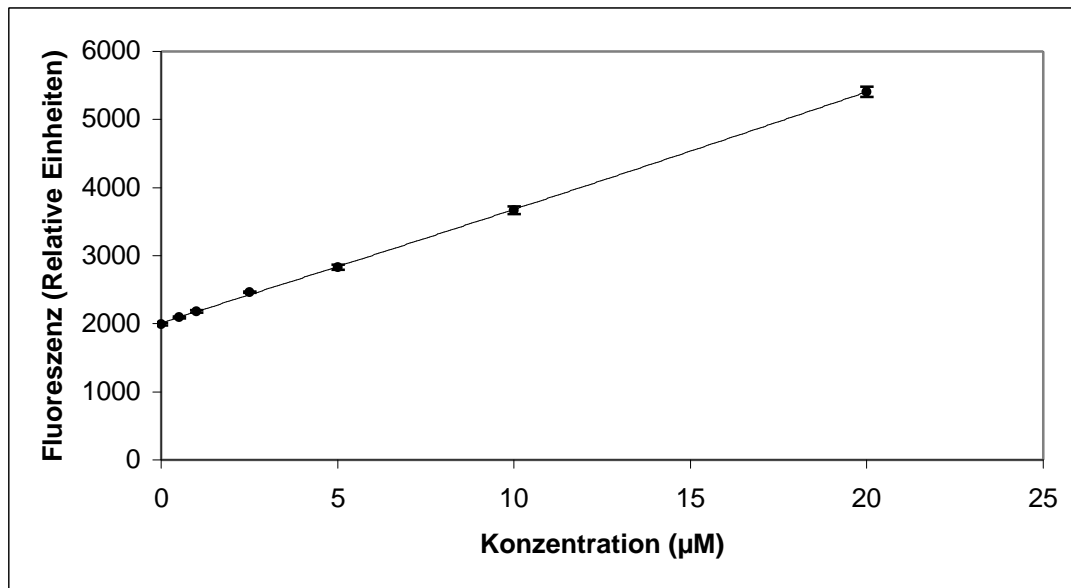


Abb. 3.44 Eichgerade Hydroxycoumarin. Exemplarische lineare Eichgerade von Hydroxycoumarin, dem Produkt der 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD). Mittelwerte aus je 4 Meßpunkten \pm SEM.

Generell konnten unabhängig von der Kulturunterlage und Mediumansatz keine oder äußerst geringe 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) Aktivitäten embryonaler Hepatozyten gemessen werden. Ebenso unabhängig von Kulturunterlage und Mediumansatz war eine stets höhere 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Aktivität als 7-Pentoxyresorufin-O-deethylase (PROD) Aktivität zu beobachten. Kulturen mit Wachstumsfaktoren wiesen gleich hohe oder leicht höhere EROD und PROD Aktivitäten auf, d.h. obwohl in diesen Ansätzen mehr Hepatozyten vorlagen, wiesen diese nicht gleich hohe Aktivitäten auf.

Hepatozyten in Kultur auf Fibroblasten (Abb. 3.51) zeigten die höchsten EROD Aktivitäten, mit etwa $3 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (ohne und mit Wachstumsfaktoren) lagen diese nach 12 DIV deutlich höher als die maximalen Aktivitäten von Hepatozyten auf Laminin ($1,6$ bzw. $2,2 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ohne und mit Wachstumsfaktoren) nach 5 DIV (Abb. 3.45) und maximalen Aktivitäten von Hepatozyten auf MRC-5 feeder-Zellen ($2,1$ bzw. $2,4 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ohne und mit Wachstumsfaktoren) nach 5 bzw. 12 DIV (Abb. 3.49). Enzymaktivitäten der EROD von Hepatozyten auf anderen Matrices oder feeder-Zellen lagen unter $2 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, geringste Aktivitäten konnten auf Collagen I und Collagen IV kultivierten Hepatozyten nachgewiesen werden.

Kulturen auf MRC-5 und 3T3 zeigten höchste Aktivitäten zu Beginn der Kultur, Hepatozyten auf primären Fibroblasten dagegen nach 12 DIV.

PROD Aktivitäten blieben sowohl in Kulturen auf Matrixproteinen als auch in Kulturen auf feeder-Zellen über den gesamten Kulturzeitraum stabil oder waren nach 12 DIV am höchsten (auf 3T3 und MRC-5 feeder-Zellen). Kulturen auf 3T3 (Abb. 3.50) feeder-Zellen zeigten maximalste PROD Aktivitäten ($0,56$ bzw. $0,57 \mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ohne und mit Wachstumsfaktoren nach 12 DIV), Kulturen auf primären Fibroblasten (Abb. 3.51) zeigten minimalste PROD Aktivität ($0,09$ bzw. $0,07 \mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ohne und mit Wachstumsfaktoren).

Enzymaktivitäten der ECOD konnten nicht oder nur äußerst schwach in Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen (Abb. 3.50) zu Beginn der Kultur ohne Wachstumsfaktoren nach 2 DIV nachgewiesen werden ($0,41 \mu\text{M}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).

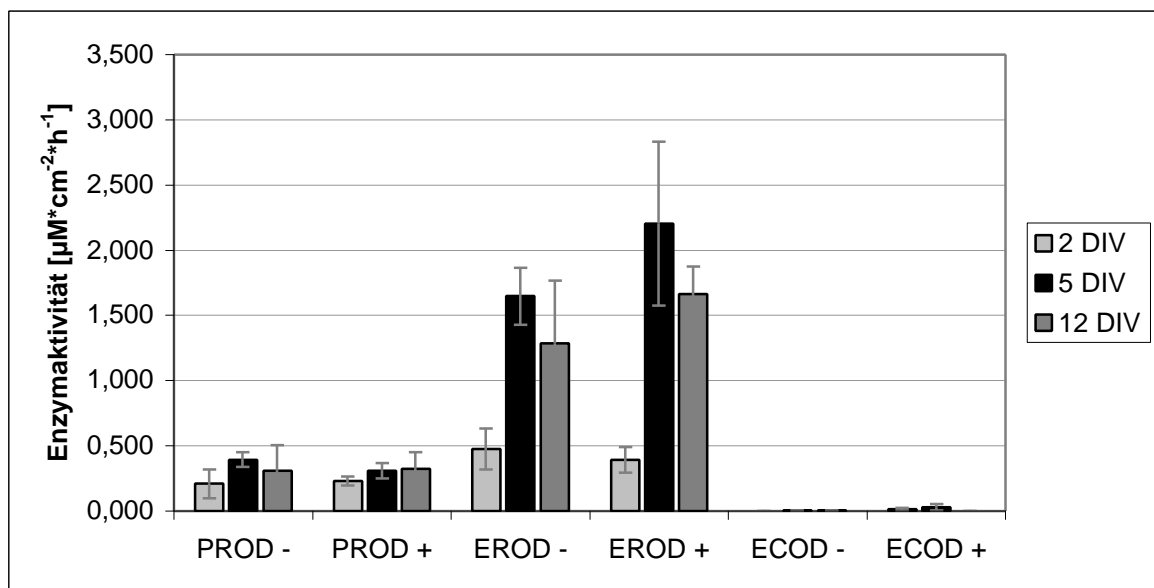


Abb. 3.45 CYP450-Aktivität auf Laminin der 7-Pentoxoresorufin-O-depenthylase (PROD), 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

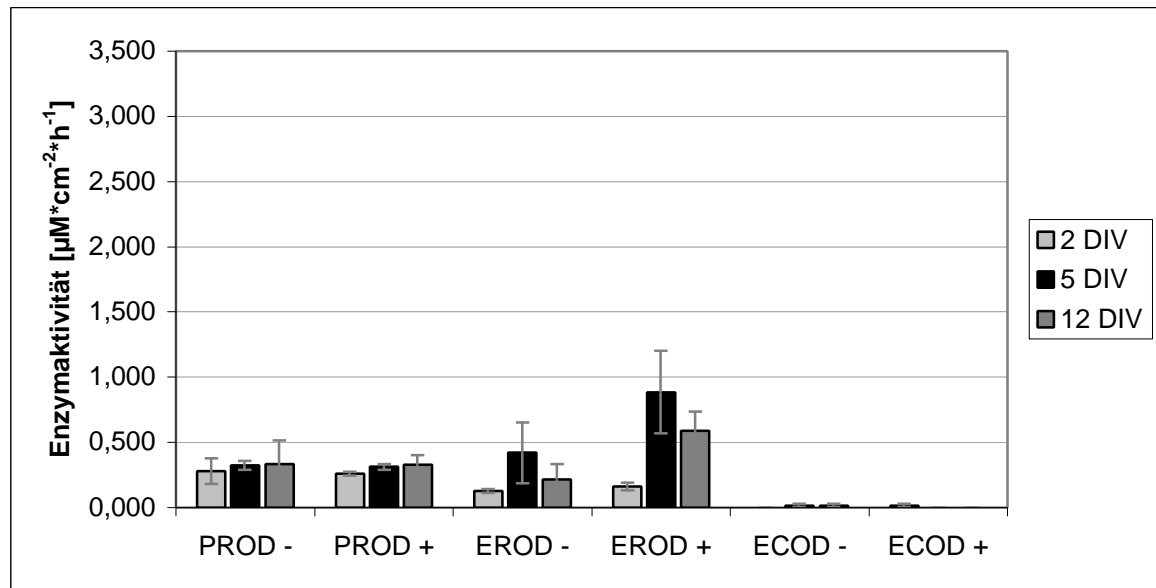


Abb. 3.46 CYP450-Aktivität auf Collagen IV der 7-Pentoxoresorufin-O-depenthylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

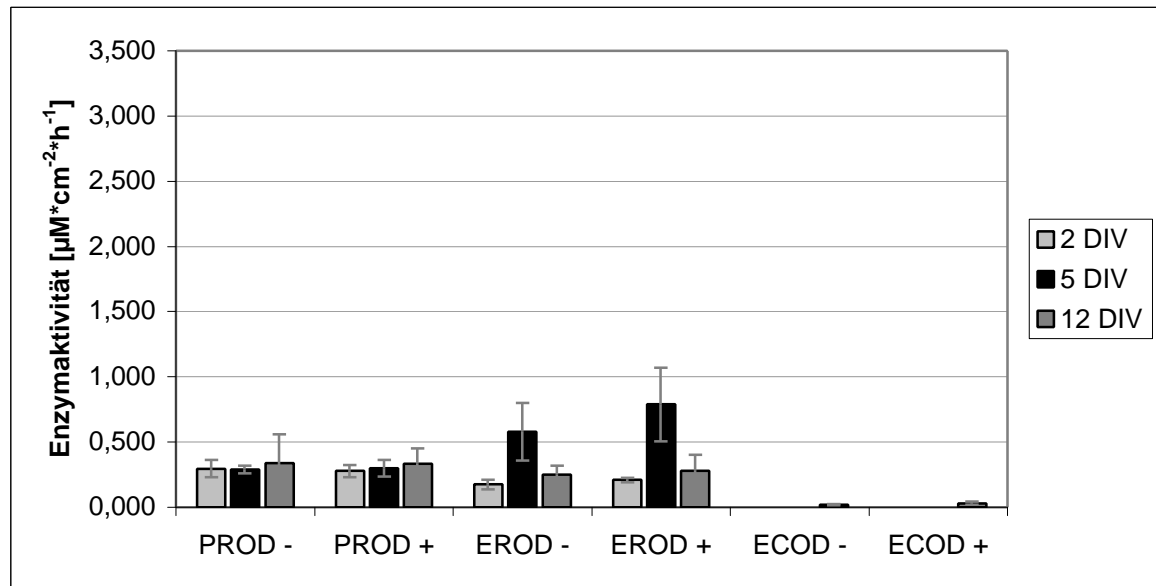


Abb. 3.47 CYP450-Aktivität auf Collagen I der 7-Pentoxoresorufin-O-depenthylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

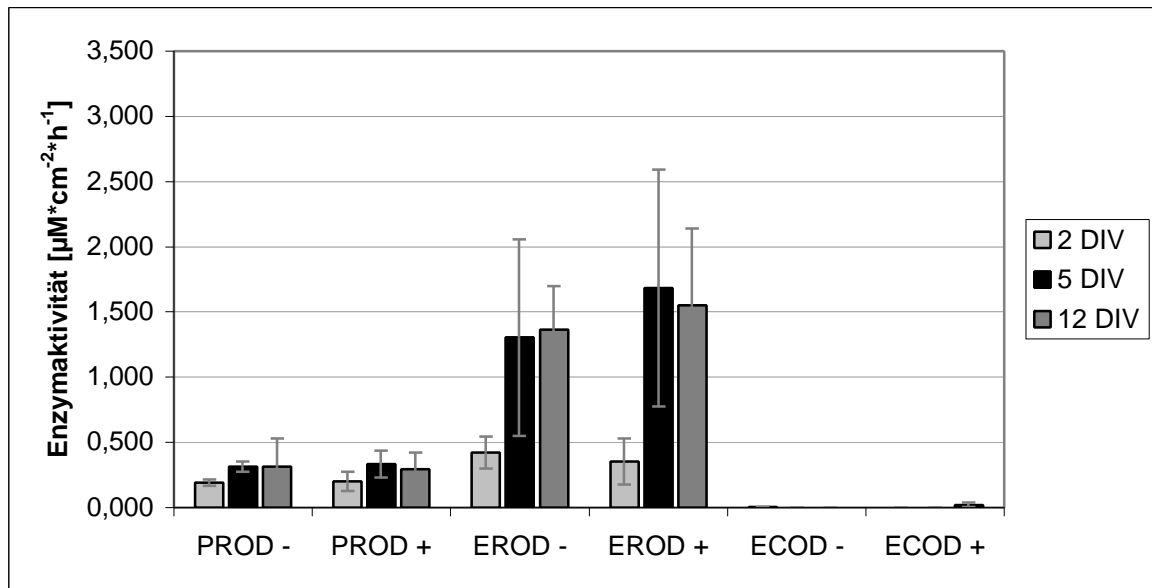


Abb. 3.48 CYP450-Aktivität auf Matrigel der 7-Pentoxoresorufin-O-depethylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

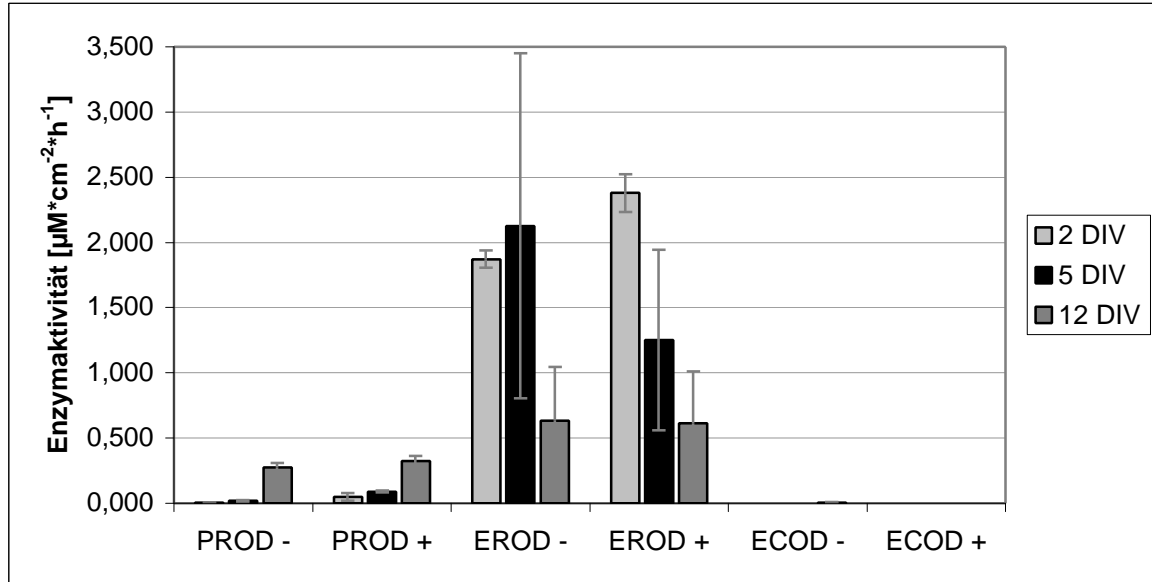


Abb. 3.49 CYP450-Aktivität auf MRC-5 feeder-Zellen der 7-Pentoxoresorufin-O-depethylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Aktivitäten der feeder-Zellen wurden subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

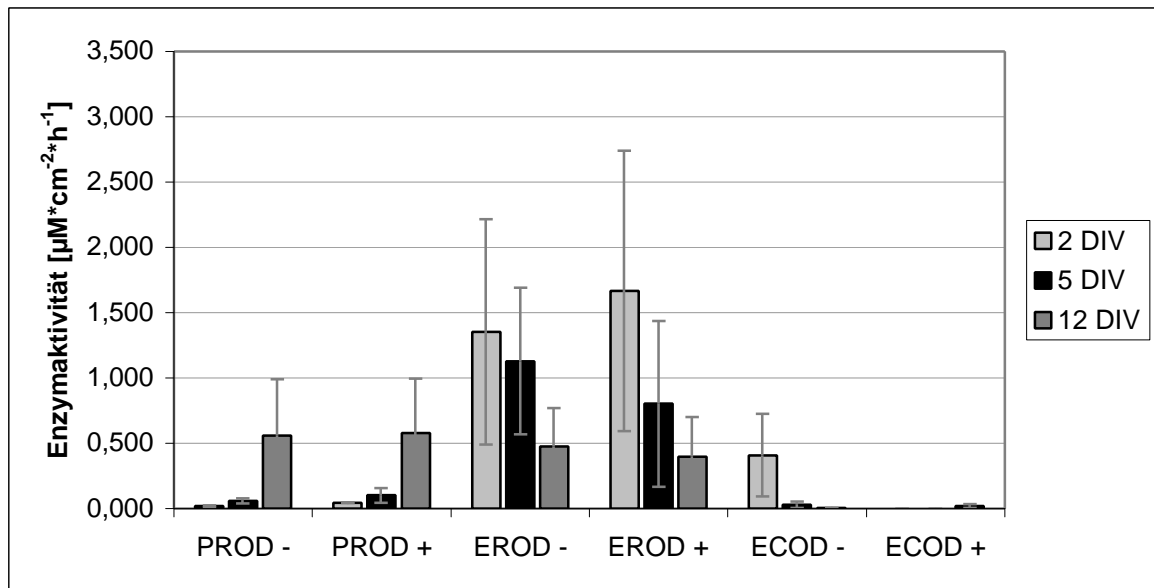


Abb. 3.50 CYP450-Aktivität auf 3T3 feeder-Zellen der 7-Pentoxoresorufin-O-depethylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Aktivitäten der feeder-Zellen wurden subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

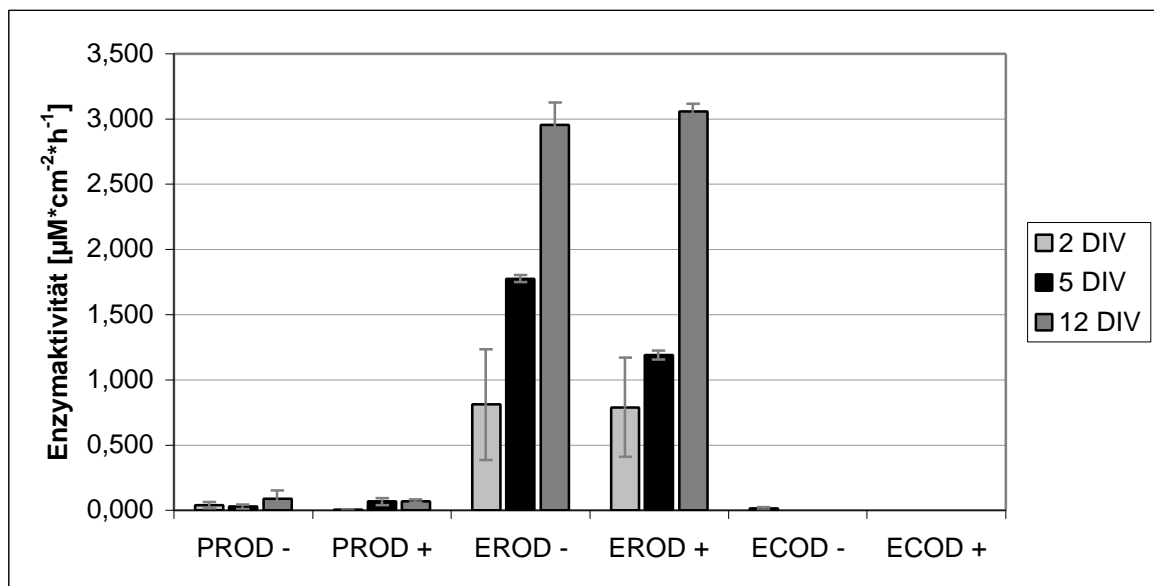


Abb. 3.51 CYP450-Aktivität auf Fibroblasten feeder-Zellen der 7-Pentoxoresorufin-O-depethylase (PROD), 7-Ethoxoresorufin-O-deethylase (EROD) und 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) induzierter embryonaler Hepatozyten nach 2, 5 und 12 Tagen in Kultur mit (+) und ohne (-) Wachstumsfaktoren. Aktivitäten der feeder-Zellen wurden subtrahiert. Mittelwerte aus 3 Präparationen mit jeweils 4 Wiederholungen \pm SEM.

3.6 Immuncytochemie

Hepatozyten wurden nach 5 und 12 Tagen in Kultur (Ansätzen A – D ohne Wachstumsfaktoren, siehe 3.2.1) bzw. 2 und 5 Tagen in Kultur (Ansätze mit Wachstumsfaktoren, siehe 3.2.2) immuncytochemisch untersucht. Dazu erhielten Hepatozyten auf Laminin, Collagen IV und Matrigel (nach 1 DIV serumhaltiger Kultur in WE mit 5% FCS) ab dem zweiten Tag in Kultur einen Zusatz von je 20 ng/ml Thrombopoietin (TPO) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) in DIF serumfrei, Hepatozyten auf Collagen I, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten einen Zusatz von 20 ng/ml Thrombopoietin.

Hepatozyten in Kultur wurden mit Paraformaldehyd fixiert und immuncytochemisch markiert. Zur Vereinheitlichung der quantitativen Bewertung erfolgten diese Markierungen nur mit dem rot fluoreszierenden sekundären TRITC Antikörper. Kulturen auf Laminin, Collagen IV, Collagen I, Matrigel, MRC-5, 3T3 und primären Fibroblasten wurden gegen Albumin, alpha-Fetoprotein (AFP), Gluthation-S-Transferase (GST) und die Cytochrome des P450-Systems (CYP) 1A1, 2B1, 2E1 und 3A2 uninduziert sowie induziert (iCYP) fluoreszenzmarkiert. Kernfärbungen erfolgten mit DAPI.

Fluoreszenzen wurden stets bei gleicher Belichtungsdauer fotografiert, die Auswertung erfolgte nach Quantität der Fluoreszenz:

Starke Färbung: xxx

Mittlere Färbung: xx

Schwache Färbung: x

Keine Färbung: 0

Bei entsprechender Vergrößerung konnten Proteine sogar intrazellulären Kompartimenten zugeordnet werden, wie z.B. Albumin am Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.53) und die GST im gesamten Zytosol (Abb. 3.52). In Kulturen auf feeder-Zellen konnte anhand der unterschiedlichen Morphologie von Hepatozyten und feeder-Zellen klar zwischen beiden Zelltypen unterschieden werden, zusätzlich konnte anhand der Kernfärbung mit DAPI klar zwischen den Zelltypen differenziert werden. Zum einen zeigten feeder-Zellen, insbesondere die Zelllinien 3T3 und MRC-5 (Abb. 3.54), weitaus größere und schwächer angefärbte

Zellkerne, zum anderen wiesen alle drei feeder-Zelltypen keine Anfärbung mit allen leberspezifischen Antikörpern auf.

Generell zeigten Hepatozyten in Kultur auf Matrices und feeder-Zellen von der eingesetzten Unterlage abhängige spezifische Morphologien. Kulturen auf den wirbelartig wachsenden, schmalen MRC-5 feeder-Zellen paßten sich der Struktur der feeder-Zellen an und wuchsen, insbesondere deutlich bei noch geringen Zelldichten zu Beginn der Kultur, ebenso in schmalen langgestreckten Wirbeln, wobei die einzelnen Hepatozyten trotzdem leberspezifische Morphologie aufwiesen. Hepatozyten auf primären Fibroblasten und Laminin dagegen bildeten eher rundliche oder ovale Aggregate aus mehreren hundert Zellen aus. Im Verlauf der Kultur zeigten vor allem Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten und 3T3 ein dreidimensionales Wachstum, d.h. Aggregate von bis zu etwa 1 mm Höhenwachstum konnten beobachtet werden.

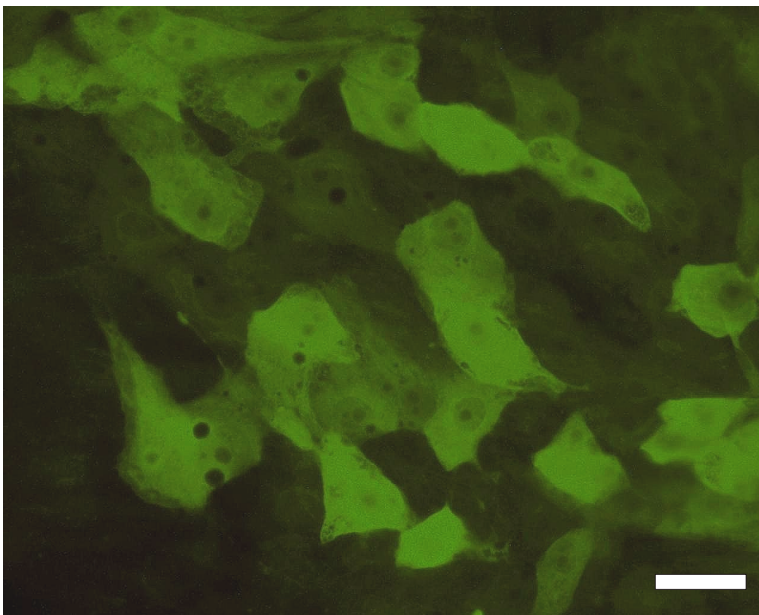


Abb. 3.52 Immuncytochemie gegen GST embryonaler Hepatozyten in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Nahezu das gesamte Zytosol wurde markiert. Balken: 25 μm .

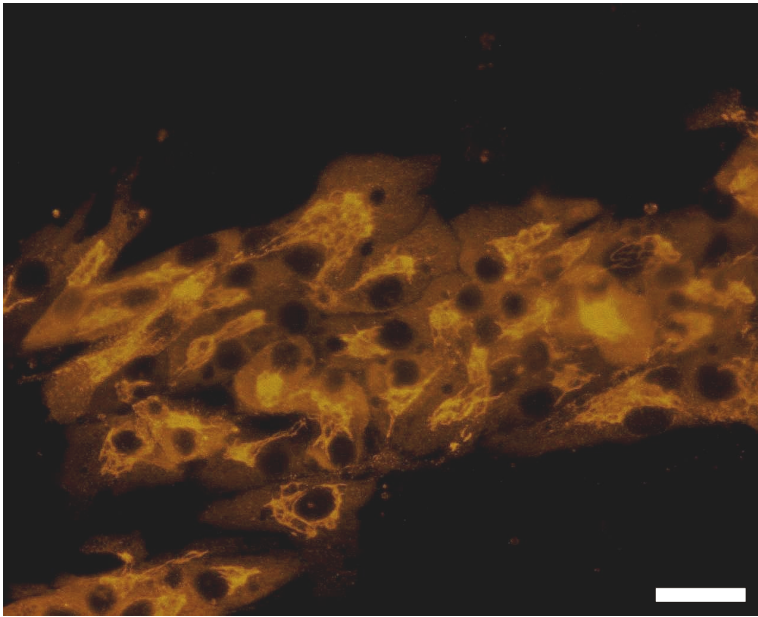


Abb. 3.53 Immuncytochemie gegen Albumin embryonaler Hepatozyten in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen nach 5 DIV mit Medium Ansatz B, gleicher Ausschnitt wie Abb. 3.54. Gut zu erkennen sind die nicht angefärbten Bereiche der Zellkerne der Hepatozyten sowie die nicht angefärbte konfluente feeder-Zellschicht. Deutlich dagegen angefärbt das Albumin am ER. Balken: 25 µm.

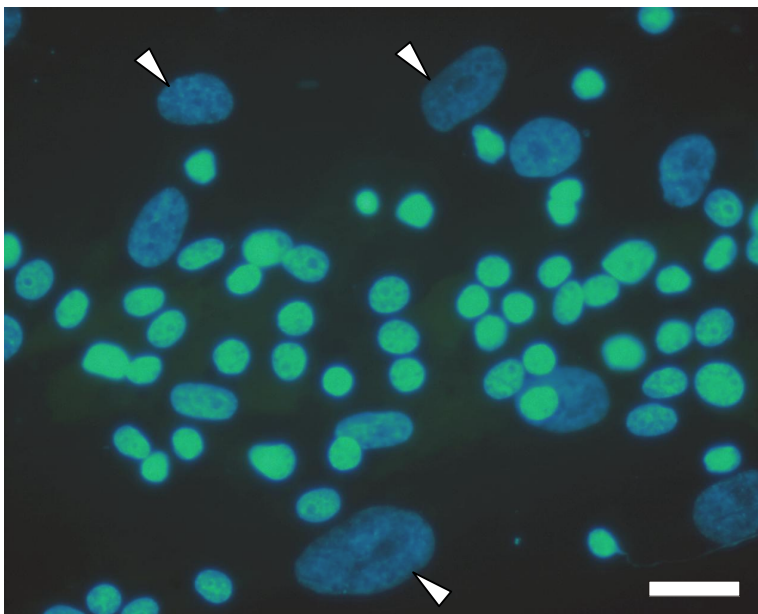


Abb. 3.54 Immuncytochemie, Kernfärbung mit DAPI, embryonale Hepatozyten in Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen nach 5 DIV mit Medium Ansatz B, gleicher Ausschnitt wie Abb. 3.53. Pfeile zeigen auf einige Zellkerne der feeder-Zellen, die deutlich in Form und Anfärbung von denen der Hepatozyten zu unterscheiden sind. Balken: 25 µm.

3.6.1 Kryotomschnitte adulter Lebern

Als Kontrollen wurden Kryotomschnitte aus adulten Lebern der Ratte angefertigt, fixiert und mit primären Antikörpern gegen Albumin, AFP, GST und die Cytochrome 1A1, 2B1, 2E1 und 3A2 konjugiert. Die primären Antikörper wurden sekundär mit TRITC gebunden und Kerngefärbt mit DAPI.

Alle Proteine konnten mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden. Bedingt durch die relativ großen interzellulären Räume der adulten Leber erscheinen die Fluoreszenzen insgesamt jedoch etwas schwächer als in Kulturen mit kompakten Zellaggregaten. Albumin ließ sich am stärksten in der Nähe von Gefäßen nachweisen, die Cytochrome (Abb. 3.55) im gesamten Lebergewebe. AFP war erwartungsgemäß in der adulten Leber kaum nachweisbar. Kernfärbungen mit DAPI (Abb. 3.54) verdeutlichen die strukturelle Konstruktion der Leber, gut zu erkennen ist das portale Trias mit V. portae, A. hepatica und Gallengang.

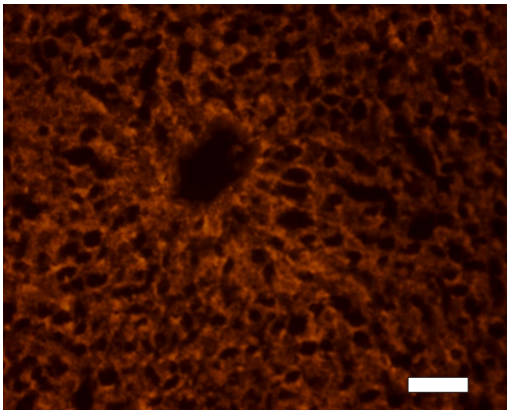


Abb. 3.55 Immunhistochemie adulter Leber gegen CYP2E1. Balken: 100 µm.

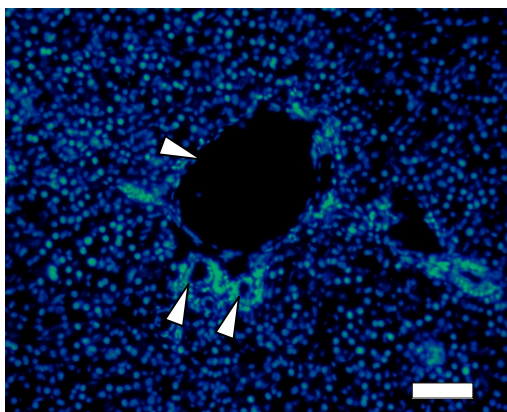


Abb. 3.56 Immunhistochemie adulter Leber, Kernfärbung mit DAPI. Pfeile weisen auf das portale Trias bestehend aus V. portae, A. hepatica und Gallengang. Balken: 200 µm.

3.6.2 Embryonale Hepatozyten in Kultur

3.6.2.1 Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz

Die Kultur von Hepatozyten ohne Wachstumsfaktoren erfolgte in vier Medienansätzen. Nach Aussaat der Zellen am Tag 0 in WE 5% FCS wurde bei Ansatz B das Medium umgestellt auf serumfreies DIF nach 1 DIV, bei Ansatz C nach 2 DIV. Kulturen mit Ansatz A erhielten ab 2 DIV serumfreies WE, Ansatz D wurde weiterhin mit WE 5% FCS kultiviert. Alle Medien enthielten Supplemente, wie sie im Material- und Methodenteil angegeben sind. Induzierte Kulturen wurden nach 1 DIV mit den jeweiligen Induktoren der Cytochrome kultiviert (siehe Material und Methoden).

Kultur auf Laminin (Tabelle 3.1)

Alle Medienansätze zeigten nach 5 DIV starke intrazelluläre Albuminexpression (Abb. 3.57), die nach 12 DIV bei den Ansätzen C-D nur noch schwach, bei Ansatz A gar nicht mehr zu erkennen war. AFP konnte zu keinem Zeitpunkt in Kultur bei keinem Ansatz nachgewiesen werden. Die Expression der GST war bei allen Ansätzen nach 5 DIV kaum zu erkennen, erhöhte sich aber nach 12 DIV bei den Ansätzen A-C, jedoch nicht bei Ansatz D. Das CYP1A1 konnte bei allen Kulturen uninduziert nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.59), lediglich Ansatz C zeigte nach 12 DIV schwache Expression. Durch Induktion konnte nach 5 DIV bei allen Ansätzen die Expression erhöht werden, sogar deutlich bei Kulturen in DIF (Abb. 3.60). Dieser Effekt konnte nach 12 DIV nicht mehr erreicht werden. Das CYP2B1 wurde schwach bei Kulturen in Ansatz C, gut bei Ansatz D nach 5 DIV nachgewiesen. Nach 12 DIV zeigten alle Kulturen schwache Expressionen. Durch induzierte Kultur konnte keine deutliche Erhöhung der Expression bei allen Ansätzen nachgewiesen werden. Nicht induziert war das CYP 2E1 in allen Ansätzen nach 5 DIV zu erkennen, Induktion führte nicht zu einer Verstärkung. 7 Tage später zeigte nur Ansatz B ein gleich bleibendes Niveau, im Ansatz A war keine CYP 2E1 nachzuweisen, C und D zeigten schwache Expressionen. Das CYP 3A2 wurde in allen Ansätzen bis auf A, wo kein Nachweis möglich war, schwach dargestellt, induzierte Kultur führte nur bei A und D zu einer

Expressionssteigerung. Längere Kultur in WE zeigte keine CYP 3A2 Expression, in DIF blieb die schwache Expression erhalten bzw. verstärkte sich in Ansatz C.

Kultur auf Collagen IV (Tabelle 3.2)

Kulturen Auf Collagen IV zeigten in den Ansätzen A-C weitaus geringere kumulative Albuminproduktion als Kulturen auf Laminin, nur im serumhaltigen Ansatz D war eine gute Anfärbung erkennbar, stärker als im Ansatz D auf Laminin. Nach 12 DIV hatte sich die Expression der Ansätze B-D nicht verändert, wohingegen im Ansatz A kein intrazelluläres Albumin mehr nachweisbar war. Wie bei allen Kulturen war AFP während der gesamten Kulturdauer nicht nachweisbar. In allen Ansätzen war die Expression der GST zu Anfang der Kultur gut bis sehr gut nachweisbar, sie nahm nach längerer Kulturdauer jedoch stark ab und war nur noch schwach im Ansatz B zu detektieren. Uninduziert konnte das CYP1A1 nur zu Beginn der Kultur nach 5 DIV nachgewiesen werden, dabei gar nicht im Ansatz A. Durch Induktion kam es nach fünf Tagen in Kultur nur in den Ansätzen A und B zu einer Verstärkung der Expression, dagegen wurde nach 12 DIV der Einfluß der Induktion durch sichtbare Expression deutlich. Das CYP2B1 war nach 5 DIV im Ansatz B am besten nachweisbar, gar nicht im Ansatz D; durch Induktion kam es nur im Ansatz D zu einer erhöhten Expression. Nach 12 DIV zeigten nur Hepatozyten des Ansatzes C deutliche Färbung, die auch nur dort durch Induktion deutlich verstärkt werden konnte. Das in allen Ansätzen nachweisbare CYP2E1 (Abb. 3.61) konnte durch induzierte Kultur mit Ethanol in seiner Expression kaum verstärkt werden (Abb. 3.62), nach 12 Tagen in Kultur nahm die Expression generell, bis auf Ansatz C, ab. Die Expressionsstärke des CYP 3A2 konnte durch induzierte Kultur nicht erhöht werden. Ansatz A wies kein CYP3A2 auf, die Ansätze in serumfreien DIF, B und C, zeigten deutliche CYP3A2 Markierung, die im Ansatz C nach 12 DIV sogar noch verstärkt zu erkennen war.

Kultur auf Collagen I (Tabelle 3.3)

Die immuncytochemische Markierung des intrazellulären Albumins war bis auf Ansatz A nur schwach, dort ließ sich angehäuften Albumin gut erkennen. Nach 12 Tagen in Kultur zeigte sich der Nachweis aber genau umgekehrt, nämlich keine Markierung im serum- und albuminfreien Ansatz A in WE und gute Markierung in den albuminhaltigen Ansätzen B-D. AFP war in keinem Ansatz nachweisbar. Die

Expression der GST blieb über den gesamten Kulturzeitraum stabil bis auf Ansatz D, hier konnte nach 12 Tagen keine GST mehr detektiert werden. Das CYP1A1 konnte nur durch induzierte Kultur nachgewiesen werden, uninduziert konnte es nicht detektiert werden. Deutlich erkennbar war das CYP2B1 nur noch 5 DIV, nach 12 Tagen in Kultur war es schwach nur noch in Kulturen mit DIF-Medium (Ansätze B und C) zu erkennen. Induktion führte nicht zu einer Erhöhung der Expression. Gut zu erkennen war die immunocytochemische Markierung des CYP2E1 nach 5 DIV im Ansatz B, alle anderen Ansätze zeigten nur schwache Markierung. Nach 12 DIV waren hingegen die Hepatozyten des Ansatzes C am stärksten markiert. Induzierte Kultur führte nicht zu einer Erhöhung der Expression. Das CYP3A2 wurde in den ersten 5 Tagen der Kultur in allen Ansätzen der Kultur schwach exprimiert, im Verlauf von 12 Kulturtagen verringerte sich die Expression nur im Ansatz D, hier war keine Markierung mehr erkennbar. Dagegen zeigte Ansatz C verstärkte Expression. Durch Induktion konnte die Expression in einigen Ansätzen erhöht werden.

Kultur auf Matrigel (Tabelle 3.4)

Kulturen auf Matrigel zeigten nach 5 DIV nur schwache intrazelluläre kumulative Albuminproduktion, Ansatz A zeigte keine Albuminmarkierung sowohl nach 5 als auch nach 12 Tagen in Kultur. Zellen des Ansatzes B wiesen stärkere Färbungen nach 12 DIV auf. Auffällig bei allen Ansätzen auf Matrigel war, daß nach 12 Tagen in Kultur sowohl die GST als auch die uninduzierten Cytochrome 1A1 und 2B1 nicht mehr nachzuweisen waren. Nach 5 Tagen in Kultur wurden die GST und alle Cytochrome schwach bis gar nicht exprimiert (Abb. 3.65), nur das CYP1A1 war in den Ansätzen mit DIF (Ansätze B und C) sowie die GST im Ansatz D (WE 5% FCS) gut zu erkennen. Wie bei Kulturen auf anderen Matrices war keine Markierung des AFP bei allen Ansätzen während der gesamten Kulturdauer zu erkennen. Durch Kultur mit Induktoren konnte vor allem in den Ansätzen mit DIF (Ansätze B und C) nach 5 und 12 DIV eine Steigerung der Expression der Cytochrome erreicht werden (Abb. 3.66).

Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen (Tabelle 3.5)

Die Ansätze A und C zeigten gut sichtbare, die Ansätze B und D schwache intrazelluläre Albuminanhäufungen, sowohl nach 5 als auch nach 12 Tagen in

Kultur. AFP war wie bei Matrixkulturen nicht zu erkennen. Die GST wurde über den gesamten Zeitraum in Kultur gut bis stark bei allen Ansätzen exprimiert. Auffällig ist, daß generell die Stärke der Expression verschiedener Proteine bei Kultur auf MRC-5 feeder-Zellen eher nicht von der Art des Mediums abhängig war, da sich bei allen Ansätzen ähnliche Expressionsmuster zeigten. Das zeigte sich nicht nur bei der GST sondern auch bei dem CYP1A1 (keine Expression), dem CYP2B1 (schwache Expression) und dem CYP2E1 (gute bis sehr gute Markierung) sowohl nach 5 als auch nach 12 DIV. Das CYP3A2 zeigte nach 5 Tagen in Kultur stärkste Expressionen in den Ansätzen B und C (DIF serumfrei). Durch Kultur mit Induktoren konnte die Stärke der immuncytochemischen Markierung erhöht werden.

Kultur auf 3T3 feeder-Zellen (Tabelle 3.6)

Nach 5 DIV zeigten alle Ansätze gute bis sehr gute (Ansatz A) Albuminexpression, die sich nach 12 Tagen in Kultur bei den Ansätzen A und D (WE-Medium) abschwächte. AFP war nicht zu detektieren. Die GST war nach 5 DIV sehr gut nachweisbar, nach 12 DIV jedoch nur noch in den Ansätzen B und C (DIF-Medium). Die Expression der Cytochrome war bei fast allen Ansätzen schwach bis gar nicht (CYP1A1) zu erkennen, sie zeigte sich jedoch nach 5 Tagen in Kultur verstärkt im Ansatz B und auch D. Durch induzierte Kultur konnte die Expression der Cytochrome erhöht werden, vor allem im Ansatz B.

Kultur auf primären Fibroblasten (Tabelle 3.7)

Unabhängig vom Mediumansatz zeigten Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten deutliche Albuminexpressionen über die gesamte Dauer der Kultur, einzig im Ansatz D (WE 5% FCS) erschien die Expression nach 12 DIV etwas abgeschwächt. AFP konnte nicht nachgewiesen werden, die Expression der GST war dagegen zu Beginn der Kultur am Tag 5 in allen Ansätzen sehr stark ausgeprägt (Abb. 3.58). Nach 12 DIV blieb diese starke Expression nur in den Ansätzen B und C (Kultur in DIF 0% FCS) erhalten und verringerte sich leicht im Ansatz A (WE 0% FCS) sowie stark im Ansatz D (WE 5% FCS). Alle Ansätze zeigten nach 5 DIV eine schwache Expression des CYP1A1, die nach 12 DIV nicht mehr nachweisbar war. Durch Induktion konnte vor allem nach 12 DIV die Expression deutlich erhöht werden. Das CYP2B1 ließ sich immuncytochemisch

deutlicher als das CYP1A1 nachweisen, wie dieses nahm auch hier die Expression nach zwölftägiger Kultur ab, war aber immer noch nachweisbar außer im Ansatz D. In induzierter Kultur konnte die Expression teilweise verstärkt werden. Die Cytochrome 2E1 (Abb. 3.63) und 3A2 wurden verstärkt in den Ansätzen B und C exprimiert, im Ansatz D zeigte sich besonders nach 12 Tagen in Kultur nur noch schwache Fluoreszenz. In induzierter Kultur zeigte sich beim CYP2E1 vor allem zu Beginn der Kultur eher eine Abschwächung der Expression (Abb. 3.64), im CYP3A2 dagegen eine Verstärkung.

3.6.2.2 Kulturen mit Wachstumsfaktorzusatz

Für die immuncytochemischen Untersuchungen mit Wachstumsfaktoren wurden die Ansätze auf verschiedenen Matrices bzw. feeder-Zellen nach zwei und fünf Tagen in Kultur fixiert und markiert. Für jede Matrix bzw. feeder-Zellart wurde dabei der bei der Zellzahlbestimmung ermittelte optimalste Wachstumsfaktorsatz benutzt. Das bedeutet, daß nach einem Tag Kultur in WE 5% FCS ohne Wachstumsfaktoren ein Mediumwechsel auf DIF 0% FCS erfolgte mit Zusatz von: Laminin, Collagen IV, Matrigel: TPO, HGF

Collagen I, MRC-5, 3T3, Fibroblasten: TPO

Die Konzentration der Wachstumsfaktoren betrug jeweils 20 ng/ml. Alle Medien enthielten Supplemente wie im Material- und Methodenteil angegeben.

Zu Beginn der Kultur zeigten alle Ansätze eine starke Albuminexpression, die nur bei Kulturen auf Collagen I und Matrigel etwas weniger stark ausgeprägt war. Schon nach fünf Tagen in Kultur war die Albuminexpression der Hepatozyten auf allen Unterlagen deutlich verringert, vor allem bei Kulturen auf Laminin, Collagen IV und primären Fibroblasten. Einzig Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen zeigten weiterhin stark ausgeprägte Fluoreszenzen.

AFP konnte nicht nachgewiesen werden, einzig Kulturen auf Collagen IV zeigten schwache Expressionen.

Nach 2 DIV war die Expression der GST auf allen Unterlagen mit Ausnahme der Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen gut bis sehr gut ausgeprägt. Auch nach 5 DIV blieb die Expressionsstärke erhalten, Kulturen auf 3T3 hatten ebenfalls eine deutliche Expression entwickelt.

Die Expression der Cytochrome 1A1 und 2B1 war in allen Kulturen kaum bzw. schwach ausgeprägt. Einzig Kulturen auf Collagen IV exprimierten nach 5 DIV deutlich beide Cytochrome, das CYP2B1 erschien ausgeprägt in Kulturen auf MRC-5 und primären Fibroblasten.

Das CYP2E1 wurde nach den ersten zwei Tagen in Kultur sehr stark nur von Hepatozyten in Kultur auf Fibroblasten exprimiert, doch auch Kulturen auf Laminin und MRC-5 zeigten deutliche Fluoreszenzen. Nach 5 DIV erschien die Fluoreszenz von Kulturen auf Laminin und Fibroblasten etwas abgeschwächt, aber auf Fibroblasten immer noch deutlich. Bis auf Kulturen auf Collagen I zeigten Hepatozyten aller weiteren Unterlagen klare Expressionen. Die Expressionen des CYP3A2 der Hepatozyten auf den verschiedenen feeder-Zellen und Beschichtungen ähnelten denen des CYP2E1, nur mit Laminin beschichtete Kulturen zeigten nach 5 DIV sehr starke CYP3A2 Fluoreszenzen im Gegensatz zu geringen CYP2E1 Expressionen.

Kulturen mit den jeweiligen Induktoren der Cytochrome zeigten bei den Cytochromen 2B1, 2E1 und 3A2 keine Verstärkung der Expression, im Gegenteil, die Fluoreszenzen erschienen deutlich schwächer. Dagegen führte induzierte Kultur zu einer deutlichen Erhöhung der CYP1A1 Expression.

Tabelle 3.1: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Laminin ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	xxx	0	x	0	0	xx	0	x	0	x	x
B 5 DIV	xxx	0	x	0	0	xx	x	xxx	x	xx	x
C 5 DIV	xxx	0	x	0	x	xx	x	xx	0	x	x
D 5 DIV	xxx	0	x	0	xx	xx	x	x	x	xx	xx
A 12 DIV	0	0	xx	0	x	0	0	0	0	xx	x
B 12 DIV	x	0	xx	0	x	xx	x	x	0	xx	x
C 12 DIV	x	0	xx	x	x	x	xx	0	xx	x	x
D 12 DIV	x	0	x	0	x	x	0	x	0	xx	x

Tabelle 3.2: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Collagen IV ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	x	0	xx	0	x	xx	0	x	x	xx	0
B 5 DIV	x	0	xxx	x	xx	xx	xx	xx	x	xx	x
C 5 DIV	x	0	xxx	xx	x	x	xx	x	x	xx	x
D 5 DIV	xx	0	xx	xx	0	x	0	xx	xx	xx	x
A 12 DIV	0	0	0	0	x	0	0	x	x	0	x
B 12 DIV	x	0	x	0	0	xx	x	x	x	x	x
C 12 DIV	x	0	0	0	xx	xx	xxx	xx	xxx	0	xxx
D 12 DIV	xx	0	0	0	0	x	x	x	0	x	x

Tabelle 3.3: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Collagen I ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	xx	0	xx	0	xx	x	x	xx	0	x	xx
B 5 DIV	x	0	xx	0	xx	xx	x	xx	0	xx	x
C 5 DIV	x	0	xx	0	xx	x	x	x	x	x	xx
D 5 DIV	x	0	xx	0	x	x	x	x	0	x	x
A 12 DIV	0	0	xx	x	0	x	x	0	x	0	x
B 12 DIV	xx	0	xx	0	x	x	xx	xx	x	x	0
C 12 DIV	xx	0	xx	0	x	xx	xx	x	x	xx	xxx
D 12 DIV	xx	0	0	0	0	x	0	0	x	0	x

Tabelle 3.4: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Matrigel ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	0	0	x	0	x	x	x	xx	0	xx	x
B 5 DIV	x	0	x	xx	0	x	0	xxx	xx	xx	xxx
C 5 DIV	x	0	x	xx	x	x	0	xx	xx	xx	xx
D 5 DIV	x	0	xx	x	x	x	0	xx	0	x	0
A 12 DIV	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	0
B 12 DIV	xx	0	0	0	0	xx	0	x	x	x	x
C 12 DIV	x	0	0	0	0	xxx	x	xx	xx	x	xxx
D 12 DIV	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3.5: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf MRC-5 feeder-Zellen ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	xx	0	xxx	0	0	xx	x	xx	0	xx	x
B 5 DIV	x	0	xx	0	x	xxx	xxx	xx	x	xx	xx
C 5 DIV	xx	0	xxx	0	x	xx	xx	xx	x	xx	xxx
D 5 DIV	x	0	xx	0	x	xx	x	xxx	0	xx	x
A 12 DIV	xx	0	xxx	0	x	xx	xx	xxx	x	xxx	xx
B 12 DIV	x	0	xxx	0	x	xx	x	xxx	xx	xx	xx
C 12 DIV	xx	0	xxx	0	x	xx	x	xx	xx	xx	xx
D 12 DIV	x	0	xx	0	0	x	x	x	0	xx	x

Tabelle 3.6: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf 3T3 feeder-Zellen ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	xxx	0	xxx	0	x	x	x	0	x	xx	xx
B 5 DIV	xx	0	xxx	xx	xx	x	xxx	xx	xx	xxx	xxx
C 5 DIV	xx	0	xxx	x	0	x	x	0	0	xx	xx
D 5 DIV	xx	0	xx	0	x	xx	xxx	0	0	xx	x
A 12 DIV	x	0	x	0	x	x	x	0	x	x	x
B 12 DIV	xx	0	xxx	0	x	x	x	0	xxx	xx	x
C 12 DIV	xx	0	xx	0	x	x	x	0	x	xxx	x
D 12 DIV	x	0	0	0	0	x	x	0	0	x	0

Tabelle 3.7: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Fibroblasten feeder-Zellen ohne Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
A 5 DIV	xx	0	xxx	x	xx	xx	xxx	xx	x	0	xx
B 5 DIV	xx	0	xxx	x	xx	xxx	xxx	xx	xx	x	xxx
C 5 DIV	xx	0	xxx	x	x	xxx	xxx	xx	xx	x	xxx
D 5 DIV	xx	0	xxx	x	xx	xx	x	x	xx	x	xxx
A 12 DIV	xx	0	xx	0	x	xx	x	xx	x	xx	x
B 12 DIV	xx	0	xxx	0	x	xxx	xx	xx	xx	xx	xx
C 12 DIV	xx	0	xxx	0	x	xx	xx	xxx	xx	xx	xx
D 12 DIV	x	0	x	0	0	x	x	x	0	x	x

Tabelle 3.8: Bewertung der Immuncytochemie. Kulturen auf Matrices und feeder-Zellen mit Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 Präparationen mit je 2 Wiederholungen.

	Albumin	AFP	GST	CYP 1A1	CYP 2B1	CYP 2E1	CYP 3A2	iCYP 1A1	iCYP 2B1	iCYP 2E1	iCYP 3A2
Laminin 2 DIV	xxx	0	xx	0	0	xx	x	xxx	0	0	xx
Coll IV 2 DIV	xxx	x	xxx	0	0	x	x	xxx	0	0	x
Coll I 2 DIV	xx	0	xx	0	0	0	0	xx	0	0	x
Matri 2 DIV	xx	0	xxx	0	0	x	x	xxx	0	x	x
MRC-5 2 DIV	xxx	0	xx	x	0	xx	xx	xx	0	x	x
3T3 2 DIV	xxx	0	x	0	0	x	xx	x	0	x	x
Fibros 2 DIV	xxx	0	xxx	0	0	xxx	xxx	x	xx	0	x
Laminin 5 DIV	x	0	xxx	0	x	x	xxx	xx	0	x	x
Coll IV 5 DIV	x	x	xxx	xx	xx	xx	xx	xxx	0	x	xx
Coll I 5 DIV	xx	0	xx	0	0	x	x	xx	0	x	x
Matri 5 DIV	x	0	xx	0	0	xx	xx	xx	x	x	xx
MRC-5 5 DIV	xx	0	xx	x	xx	xx	xx	xx	x	x	x
3T3 5 DIV	xxx	0	xx	0	x	xx	xxx	0	x	xx	xx
Fibros 5 DIV	x	0	xx	x	xx	xx	xxx	xx	x	xx	x

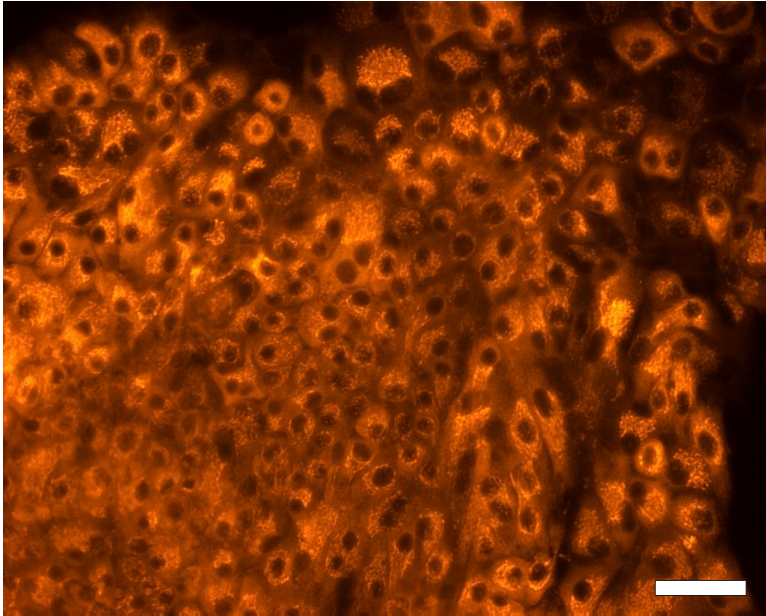


Abb. 3.57 Immuncytochemie gegen Albumin embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Laminin nach 5 DIV mit Medium Ansatz C. Balken: 50 μm .

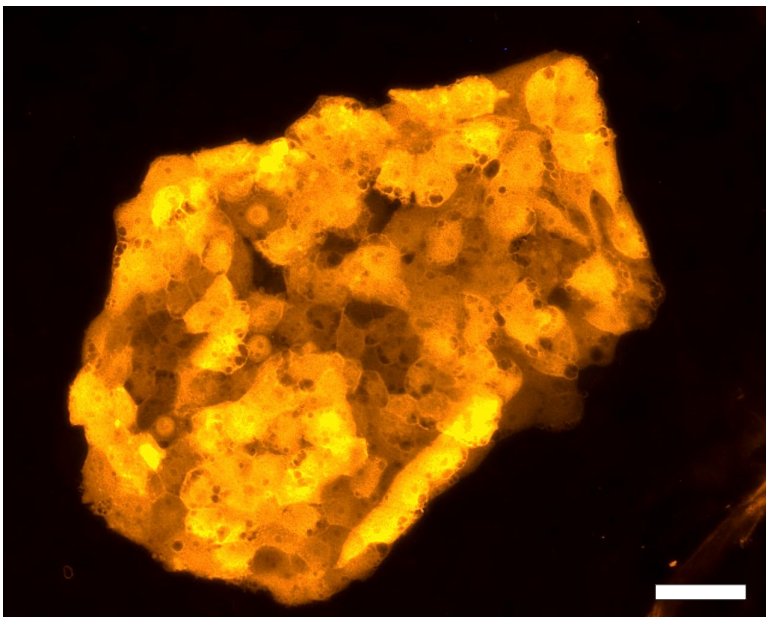


Abb. 3.58 Immuncytochemie gegen GST embryonaler Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

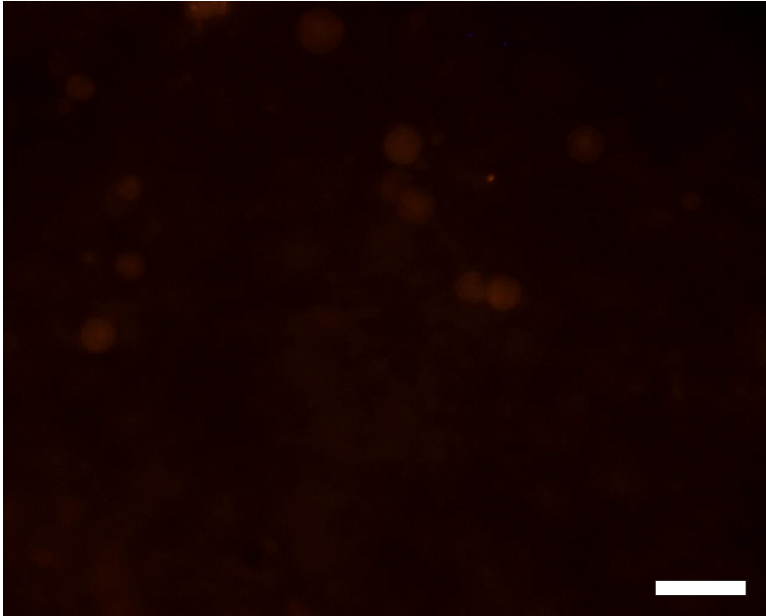


Abb. 3.59 Immuncytochemie gegen nicht induziertes CYP1A1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Laminin nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

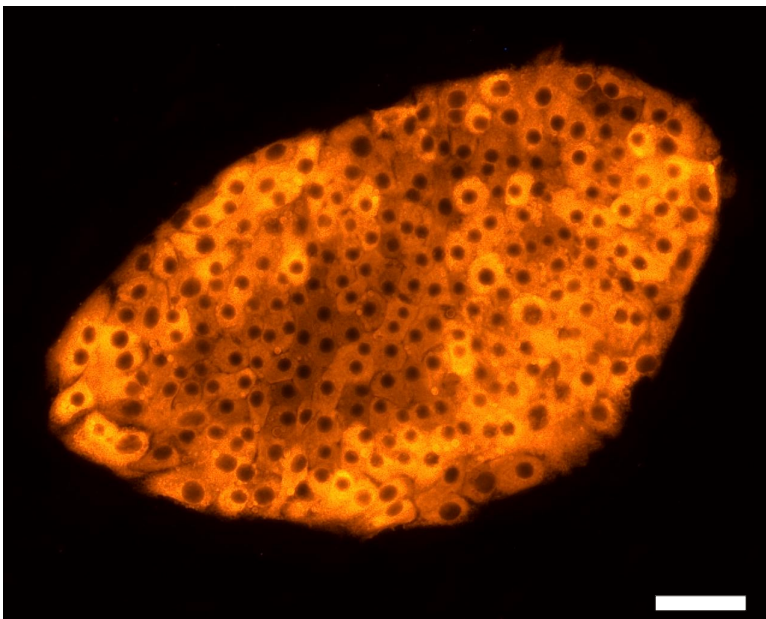


Abb. 3.60 Immuncytochemie gegen induziertes CYP1A1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Laminin nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

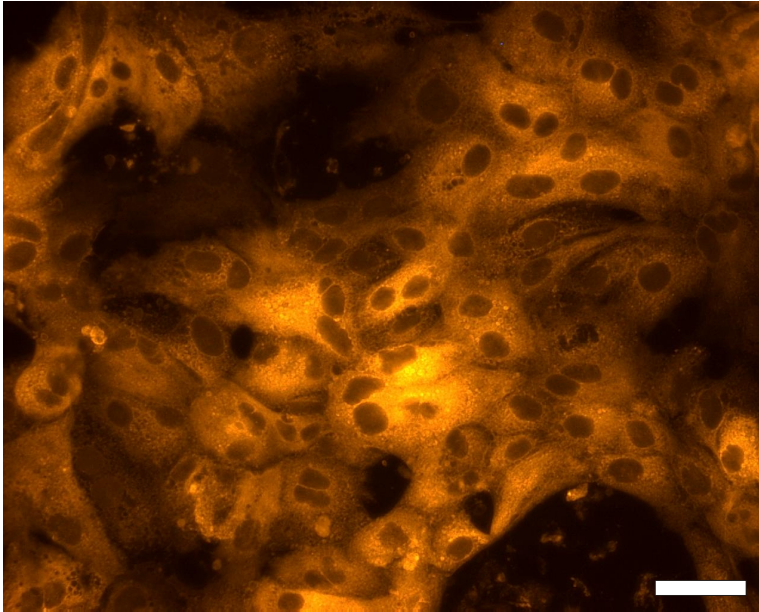


Abb. 3.61 Immuncytochemie gegen nicht induziertes CYP2E1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen IV nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

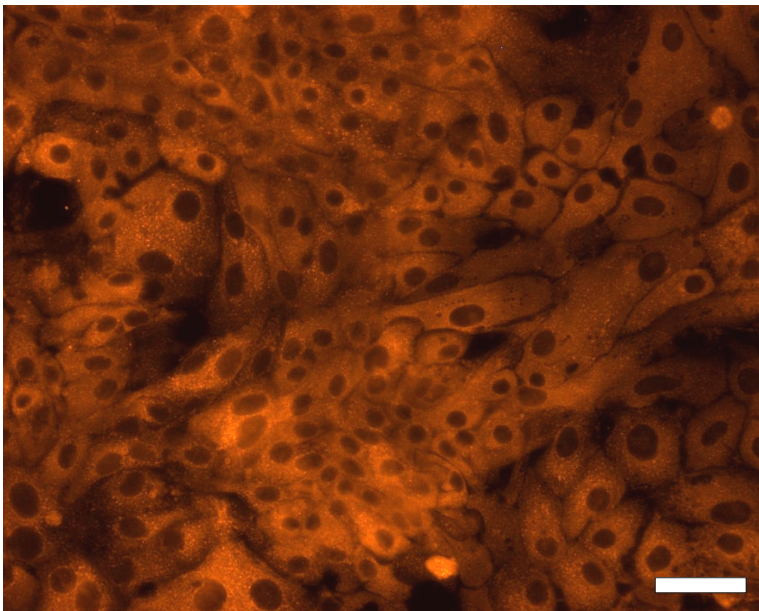


Abb. 3.62 Immuncytochemie gegen induziertes CYP2E1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Collagen IV nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

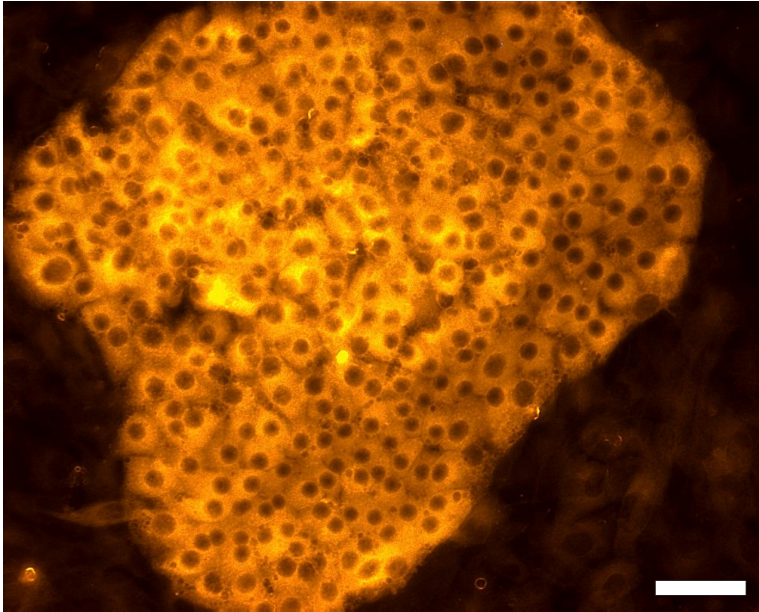


Abb. 3.63 Immuncytochemie gegen nicht induziertes CYP2E1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μ m.

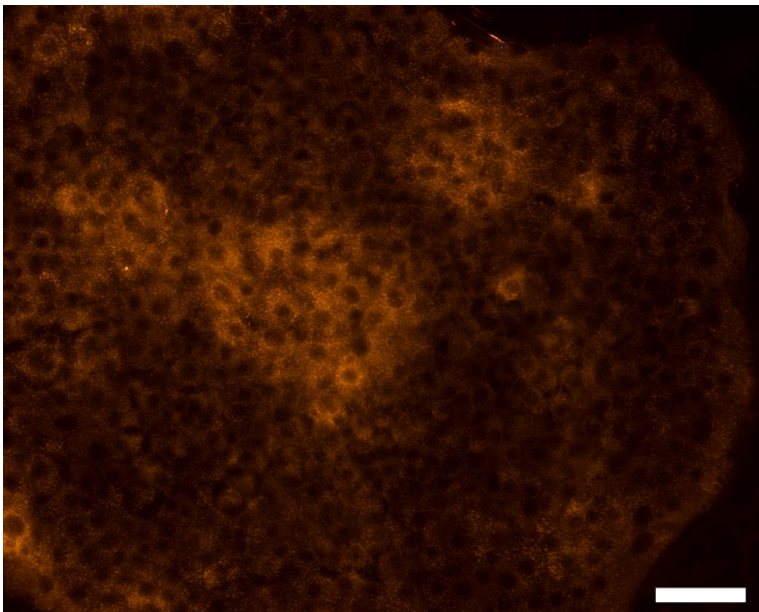


Abb. 3.64 Immuncytochemie gegen induziertes CYP2E1 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf primären Fibroblasten nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μ m.

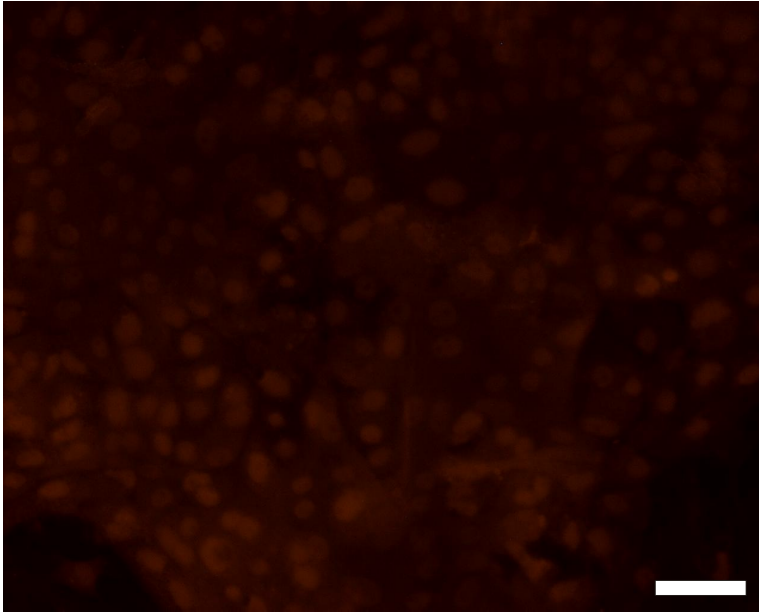


Abb. 3.65 Immuncytochemie gegen nicht induziertes CYP3A2 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Matrigel nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

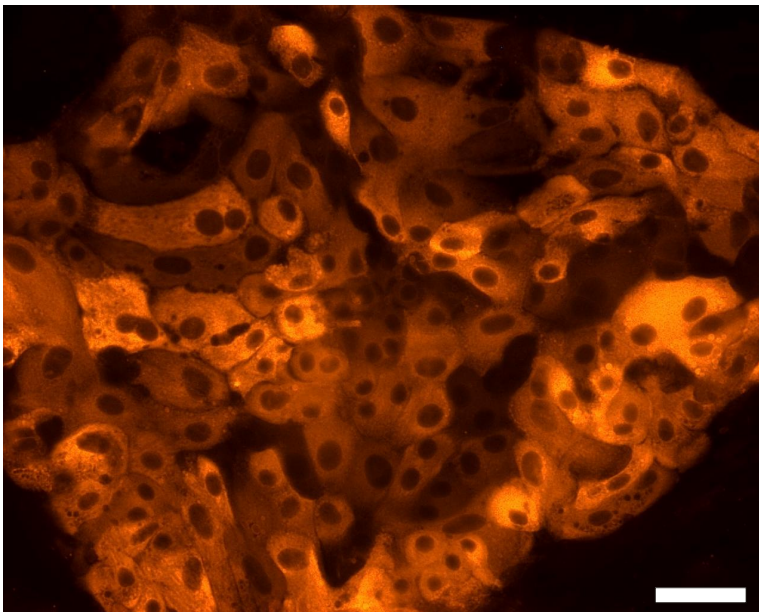


Abb. 3.66 Immuncytochemie gegen induziertes CYP3A2 embryonaler Hepatozyten in Kultur auf Matrigel nach 5 DIV mit Medium Ansatz B. Balken: 50 μm .

3.7 Albumin-mRNA *in situ* Hybridisierung

In situ Hybridisierungen gegen die Albumin mRNA wurden zusätzlich zur Messung der Albuminsekretion in den Kulturüberstand mittels ELISA und immuncytochemischer Markierung gegen Albumin durchgeführt. So konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß vorliegendes Albumin von den Hepatozyten gebildet wurde und es nicht durch im Medium vorliegendes Albumin zu falsch positiven Ergebnissen kam.

3.7.1 Kryotomschnitte adulter Lebern

Sowohl die antisense- als auch die sense-Sonde als Kontrolle wurden an Kryostatschnitten adulter Rattenlebern in ihrer Bindungsfähigkeit überprüft (Abb. 3.67). Erwartungsgemäß führte die Hybridisierung mit der antisense-Sonde zu deutlichen Anfärbungen der Hepatozyten. Bei entsprechenden Vergrößerungen konnte sogar zwischen angefärbten Hepatozyten und nicht markierten Endothelzellen der Gefäße (Abb. 3.67C) unterschieden werden.

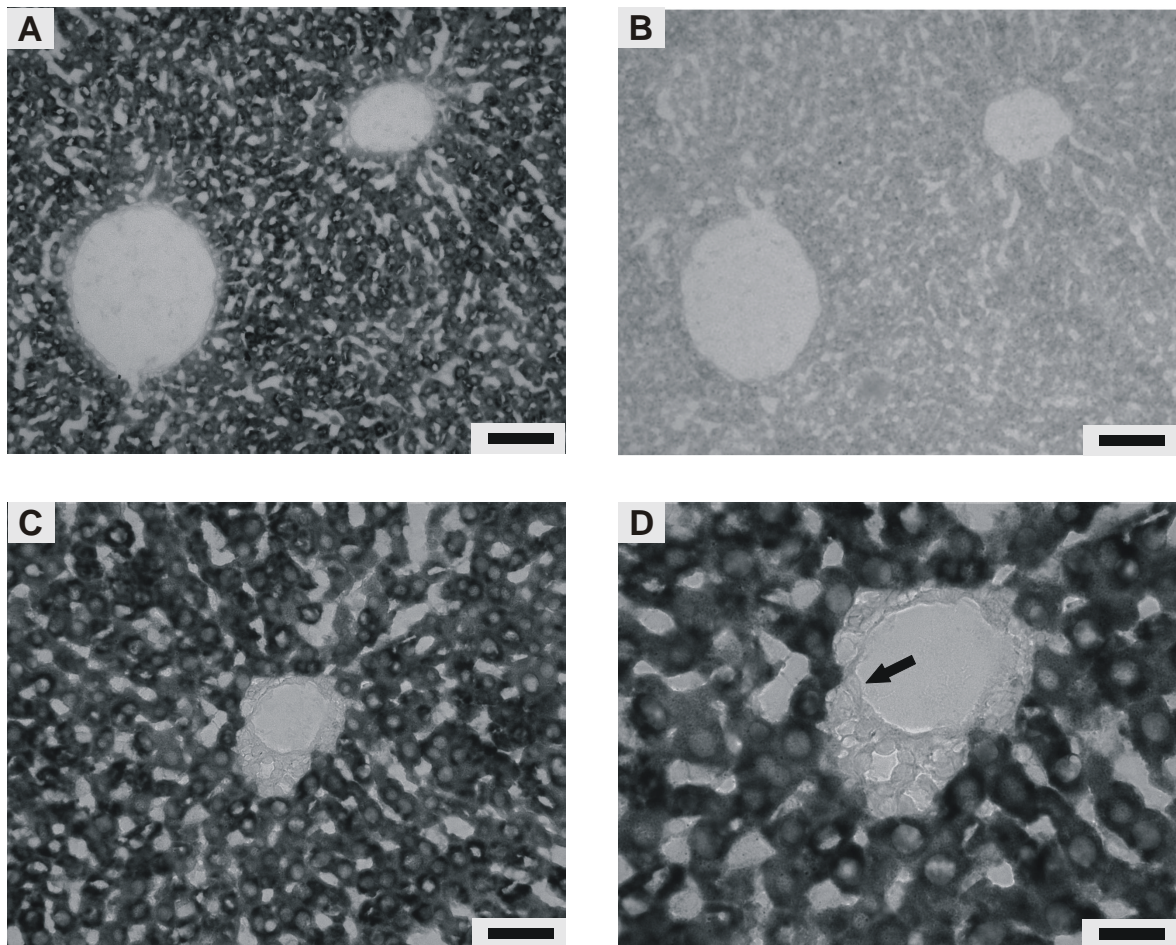


Abb. 3.67 *In situ* Hybridisierung gegen Serumalbumin-mRNA an einem Kryostatschnitt adulter Rattenleber A: Hybridisierung mit der antisense-Sonde. Balken: 200 µm.
 B: Kontrollhybridisierung mit der sense-Sonde. Balken: 200 µm.
 C: Hybridisierung mit der antisense-Sonde. Balken: 100 µm.
 D: Vergrößerung aus C, Pfeil zeigt auf negativ gefärbte Endothelzellen. Balken: 50 µm.

3.7.2 Embryonale Hepatozyten in Kultur

In situ Hybridisierungen an embryonalen Hepatozyten (Abb. 3.68) erfolgten nach 5 DIV. In allen Kulturen konnten Hepatozyten mit Albumin-mRNA nachgewiesen werden, sowohl auf feeder-Zellen als auch auf Matrices mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz zur immuncytochemischen Markierung gegen Albumin wiesen jedoch nicht alle Hepatozyten eines Ansatzes gleich intensive Markierungen auf, es waren Hepatozyten vorhanden, in denen keine Albumin-mRNA nachgewiesen werden konnte. Feeder-Zellen wurden gar nicht (MRC-5) oder äußerst schwach (3T3, primäre Fibroblasten) markiert.

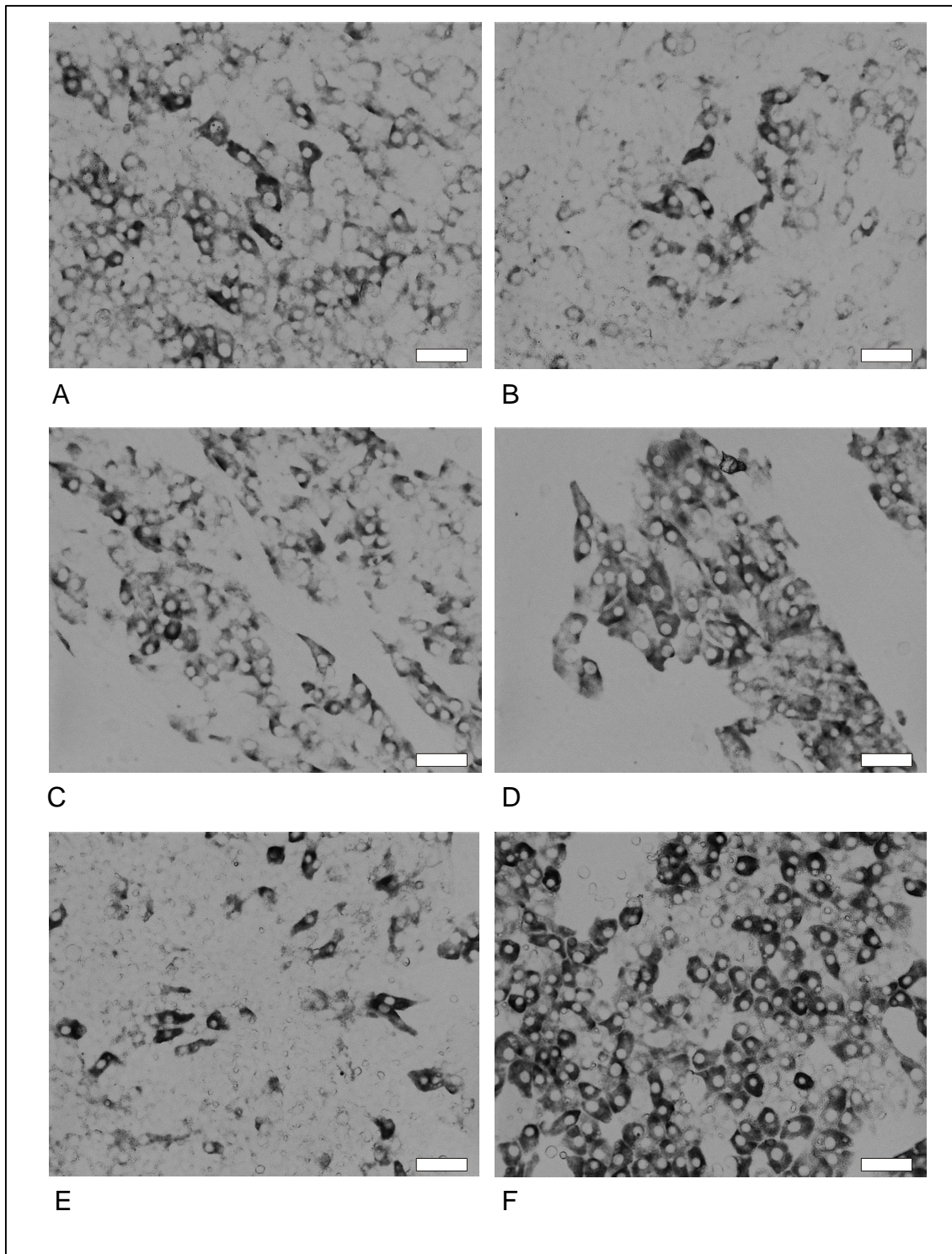


Abb. 3.68 Albumin mRNA *in situ* Hybridisierung embryonaler Hepatozyten nach 5 Tagen in Kultur auf A: Collagen I mit Wachstumsfaktor B: Collagen I ohne Wachstumsfaktoren C: MRC-5 mit Wachstumsfaktor D: MRC-5 ohne Wachstumsfaktoren E: 3T3 mit Wachstumsfaktor F: 3T3 ohne Wachstumsfaktoren. Balken: 50 μ m.

3.8 Analyse der Genexpression

Zur Analyse der Genexpression wurden DNA-Microarrays, die jeweils 72 Gene enthielten, eingesetzt. Die Auswahl der Gene erfolgte zum größten Teil leberspezifisch bzw. –relevant. Daneben wurden jedoch zu einem kleineren Anteil nicht leberspezifische Gene ausgewählt, die aber trotzdem von Interesse schienen, wie die Protooncogene (Einfluß von Wachstumsfaktoren, Organogenese).

Es konnten deutliche Unterschiede in der Expression verschiedener Gene festgestellt werden, welche durch die Intensität der Fluoreszenz dargestellt wurden. Die relativen Intensitäten der gescannten Fluoreszenzen (Beispiel eines Microarrays Abb. 3.69) wurden, nach automatischem Abzug der Hintergrundintensitäten durch die Software, nach funktionellen Gruppen geordnet tabellarisch dargestellt (Tabelle 3.9). Alle Microarrays wurden mit cDNA hybridisiert, die aus 2 µg RNA hergestellt wurde, um vergleichbare cDNA Synthesen und Meßwerte zu erhalten. RNA aus Kulturen auf feeder-Zellen enthielten sowohl feeder-Zell- als auch Hepatozyten-RNA. Es wurde daher der prozentuale Anteil der Hepatozyten-RNA zur Gesamt-RNA bestimmt. Dieser prozentuale Anteil wurde bei Berechnung der Endmeßwerte der relativen Intensitäten der Genexpression berücksichtigt.

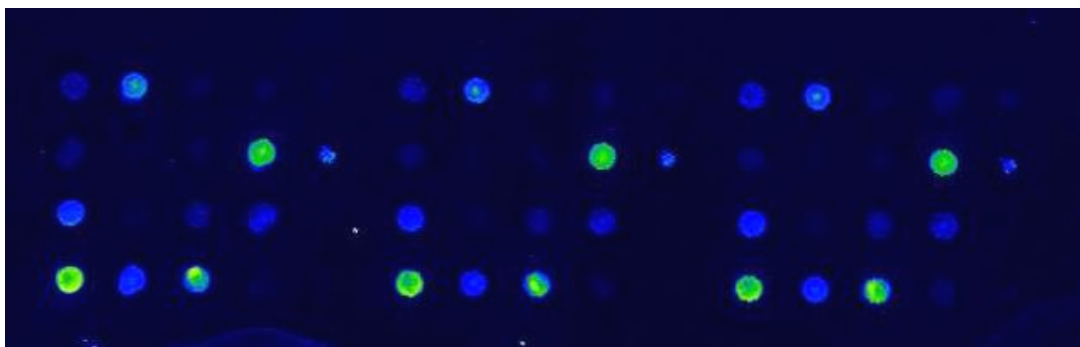


Abb. 3.69 Vergrößerter Ausschnitt aus einem Microarrayscan. Zu erkennen sind dreifach Wiederholungen (nach der fünften bzw. zehnten Spalte) unterschiedlich intensiv markierter Spots.

Tabelle 3.9: Relative Intensität der Genexpression in Zellen aus adulten und embryonalen (E12) Lebern sowie in embryonalen Hepatozyten (HZ) nach 5 Tagen in Kultur auf Collagen IV, I und 3T3, jeweils mit (+) und ohne (-) Zugabe von Wachstumsfaktoren. Mittelwerte aus 2 (Leber adult, embryonale HZ Coll IV –WF) bzw. 3 Microarrays mit je 3 identischen Spots (cDNA aus RNA gepoolt von 3 Präparationen, embryonale Leber (E12) aus 39 Lebern).

	Spotnr. und Genprodukt	Leber adult	Leber E12	Embryonale HZ Coll IV		Embryonale HZ Coll I		Embryonale HZ 3T3	
				+ WF	- WF	+ WF	- WF	+ WF	- WF
Phase-1 und -2 Enzyme	48 CYP1A1	571,3	959,3	410,1	359,6	1059,7	1743,5	1179,4	1352,4
	01 CYP2E1	861,6	421,8	419,1	434,3	522,9	621,2	1254,9	1457,8
	63 CYP3A2	469,9	496,9	436,8	444,2	540,6	797,3	1007,3	1072,9
	43 CYP4B1	866,3	489,3	423,1	467,5	506,1	600,8	1259,4	1314,5
	32 Alk DH	987,1	2382,8	491,8	399,5	1764,4	4941,8	1196,7	1309,7
	66 Ald DH	608,5	410,7	485,7	402,6	754,7	1239,8	1169,3	1388,8
	03 Ald Ox	584,4	446,3	442,4	441,9	542,5	669,4	1226,4	1381,3
	70 Ald DH liver (mito.)	4304,2	11686,2	1226,3	2314,9	2715,7	5536,1	9482,8	5302,5
	36 Monoamin Ox B	616,0	339,9	385,1	374,3	669,9	928,5	1272,4	1332,8
	37 Epoxidhydrolase	558,8	918,7	695,0	664,3	1475,4	2633,2	1481,9	1132,7
	02 Gal- β -1,3-GT	678,3	455,1	494,7	451,0	860,0	1798,8	1247,0	1459,3
	38 Hydroxysteroid ST	1047,4	320,7	392,7	381,9	636,2	822,4	1233,6	1289,0
	22 GST	821,8	378,6	530,3	420,1	934,6	1555,8	1227,5	1528,8
Matrixproteine u. -enzyme	33 Entactin	808,1	882,4	456,8	440,9	981,7	2440,2	1286,2	2331,1
	04 Fibrillin-1	594,8	416,3	468,7	406,2	1195,7	1553,6	1168,4	1371,8
	05 Fibrillin-2	730,3	890,4	2543,1	2627,8	3322,2	6667,1	1351,2	1770,2
	59 Fibronectin 1	32000,5	41308,0	7951,6	16960,8	13720,2	14304,9	47561,8	8458,3
	26 Glypican	1075,8	408,4	393,4	396,9	1310,5	5238,9	1489,4	1576,4
	07 Plasminogen Activator	552,6	414,1	451,1	424,0	572,9	815,0	1194,8	1297,7
	46 N-Heparansulfat ST	644,5	409,3	336,8	343,6	604,6	945,5	1042,1	1230,3
	29 Collagen 4a3	656,1	450,2	460,2	481,1	546,1	667,1	1350,5	1420,2
Serumproteine	74 Laminin	635,1	310,7	418,6	378,7	569,8	1473,8	1215,3	1257,4
	47 AFP	722,6	9041,7	915,0	940,9	3806,9	10960,0	1601,2	1324,8
	25 Transthyretin	4605,1	908,9	526,1	552,2	2414,8	8191,8	1443,9	1868,5
	67 Preproalbumin	27721,5	10848,1	14266,3	15596,6	15527,9	19904,3	12169,4	26725,7
Protoonogene/ WF-Rezeptoren	10 Transferrin	19331,9	1753,4	2935,1	1830,6	11441,0	23528,0	8855,7	11695,2
	68 c-fos	677,2	363,4	441,1	389,1	860,7	2714,9	1103,8	1192,3
	65 c-met	567,0	440,3	448,2	440,1	591,6	843,8	1340,4	1476,6
	56 Erb-B2	587,9	426,2	316,8	351,0	628,1	1767,4	1233,7	1244,8
	42 EGFR-Rezeptor	1175,3	439,1	429,1	412,3	1388,7	6447,7	1264,6	2096,8
	58 H-ras	859,3	330,3	378,9	375,1	699,1	2296,8	1485,1	1386,2
	09 c-myc ibp	1309,8	737,7	673,4	580,6	880,2	615,3	2388,0	3325,6
	71 c-jun	565,8	424,0	485,6	473,7	798,7	861,6	1224,2	1157,9
Transkriptionsfaktoren	49 HNF-1	738,4	734,9	430,6	421,3	816,3	1832,4	1202,3	1756,7
	08 HNF-4	510,1	326,4	321,5	365,9	522,8	715,3	1186,4	1160,1
	51 STAT 3	580,3	465,1	550,2	551,9	835,3	1317,3	1402,0	1112,6
	73 STAT 5b	522,1	362,8	366,4	391,5	460,6	659,2	1073,6	1154,1

	Spotnr. und Genprodukt	Leber adult	Leber E12	Embryonale HZ Coll IV		Embryonale HZ Coll I		Embryonale HZ 3T3	
				+ WF	- WF	+ WF	- WF	+ WF	- WF
Wachstumsfaktoren	12 NTAK	21279,2	15698,9	1930,1	5021,2	4181,9	2761,5	31091,9	6354,2
	50 TGFa	717,4	559,8	631,7	447,8	1124,8	2091,2	1705,7	2628,4
	35 bFGF	588,6	455,5	445,2	427,7	609,9	938,8	1266,1	1361,1
	60 TGFb	541,3	383,4	332,7	380,5	577,6	820,1	1213,8	1242,2
Akutphaseproteine	20 α -Macroglobulin	579,4	1175,6	3268,8	1110,1	14334,3	18762,4	1578,1	2177,2
	54 α -1-Microglobulin	6200,8	2997,9	3618,4	1821,7	3756,8	16572,5	5241,1	7520,6
	13 α -1-Acidglycoprotein	1784,8	578,9	573,4	681,6	1594,2	4187,8	1517,0	1487,6
	39 α -1-Antitrypsin	1275,9	457,8	523,4	520,1	808,9	1044,1	1225,0	1341,5
	72 α -Fibrinogen	611,1	519,4	343,9	334,3	706,4	4074,5	1093,8	1444,6
	62 Fibrinogen B β chain	1775,0	1221,2	410,9	549,7	5495,4	16450,6	2642,1	2203,5
	34 AP α -1-Protein	1486,4	738,8	4577,4	2400,9	19055,9	19374,3	3530,0	3878,2
	06 Haptoglobin	1228,0	325,1	582,9	430,2	2021,6	3950,0	1370,3	1706,4
	44 Hemopexin	3584,7	703,4	808,9	599,8	3637,8	10576,6	1784,5	2212,9
Fettstoffwechsel	53 Apolipoprotein C I	1152,3	524,3	517,3	473,0	703,5	1160,0	1266,3	1387,3
	19 Apolipoprotein A-I	907,5	2338,6	1744,0	1621,2	5823,8	14923,3	1887,8	3184,5
	27 Apolipoprotein B ep	584,8	403,3	438,9	451,4	524,2	588,5	1261,9	1450,2
	18 Apolipoprotein C-III	3150,3	498,9	447,6	400,6	939,7	1601,3	1292,2	1448,8
	41 Fatty Acid BP	2009,3	401,9	413,8	444,2	540,4	680,4	1205,4	1366,5
Aminosäure- u. Harnstoffwechsel	31 OrnithintransCA	1509,1	833,4	531,2	551,5	1522,1	2589,1	1445,2	1872,3
	69 Glutamat DH	756,7	488,9	483,8	480,5	969,7	1485,8	1315,4	1366,3
	45 Glutaminsynthetase	466,1	488,7	502,8	536,4	710,1	1124,2	1022,5	1107,1
	21 Arginase	724,3	551,8	586,1	572,5	1004,8	1519,7	1290,5	1497,8
	11 Cystinedioxygenase	1082,8	714,7	506,6	715,4	693,2	819,6	1699,3	1526,1
Energie metabolismismus	15 Cytochrom Ox (mito.)	7650,6	4505,9	1552,0	1554,7	8236,6	19740,0	2528,3	3605,8
	16 Cytochrom Ox (mito.)	3532,4	25575,9	12453,3	3754,7	20044,4	18826,0	7687,5	6526,5
	17 Cytochrom Ox (mito.)	718,1	4390,9	826,4	690,2	3445,0	13116,8	1569,2	1155,5
	40 Cytochrom Ox (mito.)	1525,5	3943,7	453,6	622,0	4552,4	18006,8	2117,0	2891,1
	14 Cytochrom Ox (mito.)	2193,3	5210,8	556,0	543,9	5814,1	13630,2	1709,4	2945,2
	00 GAPDH	762,9	7126,4	739,2	567,6	4551,4	5477,1	2598,3	2085,7
	55 Glycogensynthase 2	547,4	436,9	468,0	456,8	568,1	695,2	1360,1	1322,8
	23 Glucokinase	521,8	443,7	471,5	465,7	613,3	735,0	1217,7	1174,9
	30 Aldolase B	1345,3	509,6	354,3	382,7	775,1	1448,3	1357,1	1508,2
	64 Phosphofructokinase	1040,3	936,1	492,2	454,4	822,3	1443,4	1570,9	1668,8
Verschiedene	24 PEPCK	736,3	324,4	322,8	378,2	561,2	867,8	1198,1	1272,1
	57 GFAP	770,0	405,9	440,7	448,3	551,3	631,9	1310,3	1238,4
	61 α -Tubulin	525,9	754,1	470,9	548,1	900,3	1978,6	1085,4	1073,5
	28 Histon 3	1160,3	891,4	464,1	501,7	970,1	1095,6	1595,4	1412,2
	52 CyclinD3	738,4	734,9	703,8	535,7	1381,4	1466,1	5766,5	5814,5

Von Bedeutung ist die relative Änderung der Genexpression, so daß die Verhältnisse der Ansätze berechnet wurden (

Tabelle 3.10). So konnte direkt eine verhältnismäßige Unter- oder Überregulation der Genexpression erkannt werden. Als deutlich wurden 1,50fache, als stark 5,00fache Veränderungen der Verhältnisse angesehen und markiert. Verhältnisse unter 1,00 wurden zur optischen Verdeutlichung der relativen Unterexpression als negativer Kehrwert dargestellt. Beurteilt wurden die Veränderungen der Genexpression zwischen adulter und embryonaler (E12) Leber, zwischen 5 Tage kultivierten Hepatozyten (auf Collagen IV, I und 3T3 jeweils mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren) und embryonaler (E12) Leber, sowie zwischen 5 Tage kultivierten Hepatozyten mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren (auf Collagen IV, I und 3T3).

Ein Großteil der untersuchten Gene adulter Lebern wurde im Vergleich zu embryonalen Lebern (E12) stärker exprimiert. Insbesondere stark exprimiert wurden die adulten Serumproteine Preproalbumin (2,6fach), welches durch späteres Processing zu Albumin modifiziert wird, Transthyretin (5,1fach) und Transferrin (11fach), die Matrixproteine wie Laminin (2fach) und Glypican (2,6fach), Proteine des Fettstoffwechsels wie Fatty Acid Binding Protein (5fach) und Apolipoprotein C-III (6,3fach), Enzyme des Aminosäure- und Harnstoffwechsels sowie nahezu alle Akutphaseproteine, besonders Hemopexin (5,1fach). Auch die untersuchten Phase-2 Enzyme der Detoxifikation (Galactosid β -1,3-glucuronyltransferase, Hydroxysteroidsulfotransferase und Glutathion-S-Transferase), Protooncogene, leberspezifische Transkriptionsfaktoren sowie Wachstumsfaktoren wurden adult stärker transkribiert als embryonal. Die RNA des embryonalen Serumproteins Alpha Fetoprotein (AFP) wurde dagegen adult über 12fach geringer exprimiert als embryonal, ebenso wurde im Mittel die mitochondriale Cytochromoxidase geringer transkribiert. Die Expression der Phase-1 Enzyme der Detoxifikation erfolgte adult im Vergleich zu embryonal nicht einheitlich stärker oder geringer.

Embryonale Hepatozyten in Kultur auf Collagen IV ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren wiesen nach 5 Tagen in nahezu allen untersuchten Genen eine geringere Expression auf als embryonale Lebern (E12). Insbesondere das embryonale Serumprotein AFP (fast 10fach), Phase-1 Enzyme der Detoxifikation (Alkoholdehydrogenase 6fach, mitochondriale Aldehyddehydrogenase 5fach) und Enzyme des Energiemetabolismus (mitochondriale Cytochromoxidase im Mittel etwa 7,4fach, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase über 12fach) wurden

schwächer transkribiert. Nur das Matrixprotein Fibrillin-2 und das Akutphaseprotein α -1-Protein wurden nach 5 Tagen in Kultur stärker exprimiert als in embryonalen Lebern (3 bzw. über 3fach).

Der Zusatz von Wachstumsfaktoren (Hepatocyte Growth Factor und Thrombopoietin je 20 ng/ml) während der Kultur von embryonalen Hepatozyten auf Collagen IV hatte nach fünftägiger Kultur einen nach funktionellen Gruppen differenzierten Einfluß auf die Stärke der Genexpression. Die Expression der Phase-1 und -2 Enzyme wurde kaum verändert, nur die mitochondriale Aldehyddehydrogenase wurde in ihrer Expression um circa die Hälfte verringert. Ebenso die Matrixproteine, von denen unter Einfluß der Wachstumsfaktoren nur Fibronectin-1 halb so stark exprimiert wurde, und Wachstumsfaktoren, von denen nur der Neuregulin-like Transmembrane Activator for ErbB Kinases (NTAK) 2,6fach geringer exprimiert wurde. Eine Erhöhung der Genexpression durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren konnte bei einigen Akutphaseproteinen (α -Macroglobulin 2,9fach, α -1-Microglobulin 2fach, α -1-Protein 1,9fach und Haptoglobin 1,4fach), dem Serumprotein Transferrin (1,6fach) und der Cytochromoxidase (maximal 3,3fach) beobachtet werden.

Kulturen embryonaler Hepatozyten nach 5 Tagen *in vitro* (DIV) auf Collagen I ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren erhöhten deutlich in nahezu allen untersuchten Genen die Expression im Vergleich zu embryonalen Lebern (E12), im offensichtlichen Gegensatz zu Kulturen auf Collagen IV. Nur die Expression des NTAK, des Fibronectin-1 und der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase wurde verringert (über 5fach, 3fach bzw. 2fach). Enorm stärker waren alle untersuchten Akutphaseproteine (α -1-Protein über 26fach) und adulte Serumproteine exprimiert, deutlich auch die Protooncogene, Proteine und Enzyme des Fett-, Aminosäure-, und Harnstoffwechsels sowie Proteine des Zytoskeletts (GFAP, α -Tubulin) und des Zellteilungszyklus (CyclinD3).

Die Kultur mit Thrombopoietin (20 ng/ml) führte zu einer Erniedrigung der Genexpression fast aller untersuchten Gene nach 5 DIV in Kultur auf Collagen I im Vergleich zu Kulturen auf Collagen I ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Dabei wurden insbesondere die Expression des EGF-Rezeptors und des Akutphaseproteins α -Fibrinogen verringert (4,6fach bzw. 5,8fach). Einzig die Transkription des NTAK wurde durch den Zusatz von Wachstumsfaktor erhöht (1,5fach).

Embryonale Hepatozyten auf 3T3 feeder-Zellen zeigten nach 5 Tagen in Kultur ohne Wachstumsfaktorzusatz im Verhältnis zu embryonalen Lebern differenzierte Änderungen in der Intensität der Genexpression. Untersuchte Phase-1 und -2 Enzyme der Detoxifikation wurden meist stärker exprimiert mit Ausnahme der Alkoholdehydrogenase (1,8fach geringer) und der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase (2,2fach geringer). Die Matrixproteine wurden, bis auf Fibronectin-1 (fast 5fach erniedrigt), stärker transkribiert. Eine deutliche Verminderung in der Expression wies das embryonale Serumprotein AFP auf (über 6fach erniedrigt), dagegen erhöhte sich die Expression der adulten Serumproteine Transferrin um das 6,7fache, sowie Transthyretin und Albumin je um das doppelte. Gleichfalls verstärkte sich die Transkription der Protooncogene, der leberspezifischen Transkriptionsfaktoren, Proteine und Enzyme des Fett-, Aminosäure- und Harnstoffwechsels, Akutphaseproteine und Wachstumsfaktoren, nicht jedoch des NTAK (2,5fach erniedrigt). Enzyme der ATP-Gewinnung wurden deutlich unterexprimiert (Cytochromoxidase ca. 2,5fach geringer). Cyclin3, ein Protein des Zellteilungszyklus, wurde deutlich stärker als in embryonalen Leber transkribiert (fast 8fach).

Der Zusatz von Wachstumsfaktor (Thrombopoietin 20 ng/ml) in die Kultur embryonaler Hepatozyten auf 3T3 feeder-Zellen führte, im Gegensatz zu Kulturen auf Collagen I, bei mehreren der untersuchten Genen zu einer erhöhten Expression im Verhältnis zu Kulturen ohne Wachstumsfaktorzusatz. Deutlich verstärkte sich die Expression des Matrixproteins Fibronectin-1 (5,6fach) und des NTAK (4,9fach), wie auch des Phase-1 Enzyms mitochondriale Aldehyddehydrogenase (1,8 fach). Deutlich verringerte sich die Expression des Albumins (2,2fach).

Tabelle 3.10: Verhältnisse der relativen Intensität der Genexpression aus Tabelle 3.9. Verhältnisse unter 1,00 wurden zur Verdeutlichung der Unterexpression als negativer Kehrwert dargestellt. Farblich markiert wurden Verhältnisse über 1,50fach hellrot, über 5,00fach dunkelrot, unter 1,50fach hellgrün und unter 5,00fach dunkelgrün.

	Spotnr. und Genprodukt	Leber adult Leber E12	HZ Coll IV +WF Leber E12	HZ Coll IV -WF Leber E12	HZ Coll I +WF Leber E12	HZ Coll I -WF Leber E12	HZ 3T3 +WF Leber E12	HZ 3T3 -WF Leber E12	HZ Coll IV +WF HZ Coll IV -WF	HZ Coll I +WF HZ Coll I -WF	HZ 3T3 +WF HZ 3T3 -WF
Phase-1 und -2 Enzyme	48 CYP1A1	-1,7	-2,3	-2,7	1,1	1,8	1,2	1,4	1,1	-1,6	-1,1
	01 CYP2E1	2,0	-1,0	1,0	1,2	1,5	3,0	3,5	-1,0	-1,2	-1,2
	63 CYP3A2	-1,1	-1,1	-1,1	1,1	1,6	2,0	2,2	-1,0	-1,5	-1,1
	43 CYP4B1	1,8	-1,2	-1,0	1,0	1,2	2,6	2,7	-1,1	-1,2	-1,0
	32 Alk DH	-2,4	-4,8	-6,0	-1,4	2,1	-2,0	-1,8	1,2	-2,8	-1,1
	66 Ald DH	1,5	1,2	-1,0	1,8	3,0	2,8	3,4	1,2	-1,6	-1,2
	03 Ald Ox	1,3	-1,0	-1,0	1,2	1,5	2,7	3,1	1,0	-1,2	-1,1
	70 Ald DH liver (mito.)	-2,7	-9,5	-5,0	-4,3	-2,5	-1,2	-2,2	-1,9	-2,0	1,8
	36 Monoamin Ox B	1,8	1,1	1,1	2,0	2,7	3,7	3,9	1,0	-1,4	-1,0
	37 Epoxidhydrolase	-1,6	-1,3	-1,4	1,6	2,9	-1,2	1,2	1,0	-1,8	1,3
	02 Gal-β-1,3-GT	1,5	1,1	-1,0	1,9	4,0	2,7	3,2	1,1	-2,1	-1,2
	38 Hydroxysteroid ST	3,3	1,2	1,2	2,0	2,6	3,8	4,0	1,0	-1,3	-1,0
	22 GST	2,2	1,4	1,1	2,5	4,1	3,2	4,0	1,3	-1,7	-1,2
Matrixproteine u. -enzyme	33 Entactin	-1,1	-1,9	-2,0	1,1	2,8	1,5	2,6	1,0	-2,5	-1,8
	04 Fibrillin-1	1,4	1,1	-1,0	2,9	3,7	2,8	3,3	1,2	-1,3	-1,2
	05 Fibrillin-2	-1,2	2,9	3,0	3,7	7,5	1,5	2,0	-1,0	-2,0	-1,3
	59 Fibronectin-1	-1,3	-5,2	-2,4	-3,0	-2,9	1,2	-4,9	-2,1	-1,0	5,6
	26 Glypican	2,6	-1,0	-1,0	3,2	12,8	3,6	3,9	-1,0	-4,0	-1,1
	07 Plasminogen Activator	1,3	1,1	1,0	1,4	2,0	2,9	3,1	1,1	-1,4	-1,1
	46 N-Heparansulfat ST	1,6	-1,2	-1,2	1,5	2,3	2,5	3,0	-1,0	-1,6	-1,2
	29 Collagen 4a3	1,5	1,0	1,1	1,2	1,5	3,0	3,2	-1,0	-1,2	-1,1
Serumproteine	74 Laminin	2,0	1,3	1,2	1,8	4,7	3,9	4,0	1,1	-2,6	-1,0
	47 AFP	-12,5	-9,9	-9,6	-2,4	1,2	-5,6	-6,8	-1,0	-2,9	1,2
	25 Transthyretin	5,1	-1,7	-1,6	2,7	9,0	1,6	2,1	-1,0	-3,4	-1,3
	67 Preproalbumin	2,6	1,3	1,4	1,4	1,8	1,1	2,5	-1,1	-1,3	-2,2
Protooncogene/ WF-Rezeptoren	10 Transferrin	11,0	1,7	1,0	6,5	13,4	5,1	6,7	1,6	-2,1	-1,3
	68 c-fos	1,9	1,2	1,1	2,4	7,5	3,0	3,3	1,1	-3,2	-1,1
	65 c-met	1,3	1,0	-1,0	1,3	1,9	3,0	3,4	1,0	-1,4	-1,1
	56 Erb-B2	1,4	-1,3	-1,2	1,5	4,1	2,9	2,9	-1,1	-2,8	-1,0
	42 EGF-Rezeptor	2,7	-1,0	-1,1	3,2	14,7	2,9	4,8	1,0	-4,6	-1,7
	58 H-ras	2,6	1,1	1,1	2,1	7,0	4,5	4,2	1,0	-3,3	1,1
	09 c-myc ibp	1,8	-1,1	-1,3	1,2	-1,2	1,8	2,6	1,2	1,4	-1,5
	71 c-jun	1,3	1,1	1,1	1,9	2,0	2,9	2,7	1,0	-1,1	1,1
Transkriptionsfaktoren	49 HNF-1	1,1	-1,5	-1,6	1,2	2,8	1,8	2,6	1,0	-2,2	-1,5
	08 HNF-4	1,6	-1,0	1,1	1,6	2,2	3,6	3,6	-1,1	-1,4	1,0
	51 STAT 3	1,2	1,2	1,2	1,8	2,8	3,0	2,4	-1,0	-1,6	1,3
	73 STAT 5b	1,4	1,0	1,1	1,3	1,8	3,0	3,2	-1,1	-1,4	-1,1

	Spotnr. und Genprodukt	Leber adult Leber E12	HZ Coll IV +WF Leber E12	HZ Coll IV -WF Leber E12	HZ Coll I +WF Leber E12	HZ Coll I -WF Leber E12	HZ 3T3 +WF Leber E12	HZ 3T3 -WF Leber E12	HZ Coll IV +WF HZ Coll IV -WF	HZ Coll I +WF HZ Coll I -WF	HZ 3T3 +WF HZ 3T3 -WF
Wachstums- faktoren	12 NTAK	1,4	-8,1	-3,1	-3,8	-5,7	2,0	-2,5	-2,6	1,5	4,9
	50 TGFa	1,3	1,1	-1,3	2,0	3,7	3,0	4,7	1,4	-1,9	-1,5
	35 bFGF	1,3	-1,0	-1,1	1,3	2,1	2,8	3,0	1,0	-1,5	-1,1
	60 TGFb	1,4	-1,2	-1,0	1,5	2,1	3,2	3,2	-1,1	-1,4	-1,0
Akutphaseproteine	20 α-Macroglobulin	-2,0	2,8	-1,1	12,2	16,0	1,3	1,9	2,9	-1,3	-1,4
	54 α-1-Microglobulin	2,1	1,2	-1,6	1,3	5,5	1,7	2,5	2,0	-4,4	-1,4
	13 α-1-Acidglycoprotein	3,1	-1,0	1,2	2,8	7,2	2,6	2,6	-1,2	-2,6	1,0
	39 α-1-Antitrypsin	2,8	1,1	1,1	1,8	2,3	2,7	2,9	1,0	-1,3	-1,1
	72 α-Fibrinogen	1,2	-1,5	-1,6	1,4	7,8	2,1	2,8	1,0	-5,8	-1,3
	62 Fibrinogen B β chain	1,5	-3,0	-2,2	4,5	13,5	2,2	1,8	-1,3	-3,0	1,2
	34 AP α-1-Protein	2,0	6,2	3,2	25,8	26,2	4,8	5,2	1,9	1,0	-1,1
	06 Haptoglobin	3,8	1,8	1,3	6,2	12,1	4,2	5,2	1,4	-2,0	-1,2
	44 Hemopexin	5,1	1,1	-1,2	5,2	15,0	2,5	3,1	1,3	-2,9	-1,2
Fettstoffwechsel	53 Apolipoprotein C I	2,2	-1,0	-1,1	1,3	2,2	2,4	2,6	1,1	-1,6	-1,1
	19 Apolipoprotein A-I	-2,6	-1,3	-1,4	2,5	6,4	-1,2	1,4	1,1	-2,6	-1,7
	27 Apolipoprotein B ep	1,4	1,1	1,1	1,3	1,5	3,1	3,6	-1,0	-1,1	-1,1
	18 Apolipoprotein C-III	6,3	-1,1	-1,2	1,9	3,2	2,6	2,9	1,1	-1,7	-1,1
	41 Fatty Acid BP	5,0	1,0	1,1	1,3	1,7	3,0	3,4	-1,1	-1,3	-1,1
Aminosäure- u. Harnstoffwechsel	31 OrnithintransCA	1,8	-1,6	-1,5	1,8	3,1	1,7	2,2	-1,0	-1,7	-1,3
	69 Glutamat DH	1,5	-1,0	-1,0	2,0	3,0	2,7	2,8	1,0	-1,5	-1,0
	45 Glutaminsynthetase	-1,0	1,0	1,1	1,5	2,3	2,1	2,3	-1,1	-1,6	-1,1
	21 Arginase	1,3	1,1	1,0	1,8	2,8	2,3	2,7	1,0	-1,5	-1,2
	11 Cystinedioxygenase	1,5	-1,4	1,0	-1,0	1,1	2,4	2,2	-1,4	-1,2	1,1
Energiemetabolismus	15 Cytochrom Ox (mito.)	1,7	-2,9	-2,9	1,8	4,4	-1,8	-1,2	-1,0	-2,4	-1,4
	16 Cytochrom Ox (mito.)	-7,2	-2,1	-6,8	-1,3	-1,4	-3,3	-3,9	3,3	1,1	1,2
	17 Cytochrom Ox (mito.)	-6,1	-5,3	-6,4	-1,3	3,0	-2,8	-3,8	1,2	-3,8	1,4
	40 Cytochrom Ox (mito.)	-2,6	-8,7	-6,3	1,2	4,6	-1,9	-1,4	-1,4	-4,0	-1,4
	14 Cytochrom Ox (mito.)	-2,4	-9,4	-9,6	1,1	2,6	-3,0	-1,8	1,0	-2,3	-1,7
	00 GAPDH	-9,3	-9,6	-12,6	-1,6	-1,3	-2,7	-3,4	1,3	-1,2	1,2
	55 Glycogensynthase 2	1,3	1,1	1,0	1,3	1,6	3,1	3,0	1,0	-1,2	1,0
	23 Glucokinase	1,2	1,1	1,0	1,4	1,7	2,7	2,6	1,0	-1,2	1,0
	30 Aldolase B	2,6	-1,4	-1,3	1,5	2,8	2,7	3,0	-1,1	-1,9	-1,1
	64 Phosphofructokinase	1,1	-1,9	-2,1	-1,1	1,5	1,7	1,8	1,1	-1,8	-1,1
Verschiedene	24 PEPCK	2,3	-1,0	1,2	1,7	2,7	3,7	3,9	-1,2	-1,5	-1,1
	57 GFAP	1,9	1,1	1,1	1,4	1,6	3,2	3,1	-1,0	-1,1	1,1
	61 α-Tubulin	-1,4	-1,6	-1,4	1,2	2,6	1,4	1,4	-1,2	-2,2	1,0
	28 Histon 3	1,3	-1,9	-1,8	1,1	1,2	1,8	1,6	-1,1	-1,1	1,1
	52 CyclinD3	1,0	-1,0	-1,4	1,9	2,0	7,8	7,9	1,3	-1,1	-1,0

3.9 Signifikanzanalyse

Es erfolgte eine Signifikanzanalyse der Zellzahlen nach 5 Tagen in Kultur von Hepatozyten, die auf unterschiedlichen Beschichtungen bzw. feeder-Zellen mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Dabei wurde ermittelt, ob der Zusatz von Wachstumsfaktor(en) zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl führte (jeweils im Vergleich zu Kontrollen ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren). Der für jede Beschichtung optimale Wachstumsfaktorzusatz wurde ausgewählt:

Beschichtung bzw. feeder Zellen	Auf Signifikanz ($\alpha = 0,0500$) untersuchter Ansatz Nr.	Zellzahl signifikant zu Kontrollansatz Nr.1:
Laminin	12	ja
Collagen IV	12	ja
Collagen I	6	ja
Matrigel	12	nein
3T3	6	ja
MRC-5	6	ja
FIB	6	nein

Die Analyse ergab, daß bis auf Kulturen auf Matrigel und primären Fibroblasten der Zusatz von Wachstumsfaktor(en) zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl führte.

4 Diskussion

Erste Kulturen adulter primärer Hepatozyten wurden zu Beginn der 50er Jahre angelegt (Evans *et al.*, 1952). Bis zu einer Einführung einer optimierten Isolation der Hepatozyten durch Perfusion der Leber war es aber nicht möglich, Hepatozyten *in vitro* über einen längeren Zeitraum in Kultur ohne Verlust ihrer leberspezifischen Funktionen zu halten. Verbesserungen der von Berry und Friend, 1969 etablierten Perfusionsmethode durch Seglen, 1976 führten zur schonenderen Isolation der Hepatozyten und höheren Überlebensraten. Neben Kulturen vereinzelter, adhärent wachsender Hepatozyten wurden auch Gewebekulturen aus dem Ganzorgan (Bevan *et al.*, 1965) sowie Suspensionskulturen (Gerschenson und Casanello, 1968) entwickelt. Gewebekulturen werden auch heute noch, vor allem in der pharmazeutischen Forschung, eingesetzt. Sie besitzen für kurze Zeit das gesamte Spektrum leberspezifischer metabolischer Aktivität (Barr *et al.*, 1991; Dogterom, 1993), ihr Einsatz ist aber durch den raschen Verlust ihrer Kapazität auf etwa 24 h begrenzt. Ebenso weisen Suspensionskulturen einen raschen Verlust ihres leberspezifischen Metabolismus auf, speziell des Cytochrom P450 Systems (Blaauboer *et al.*, 1990; Chenery, 1988). Fortschritte in der adhärenenten Kultur adulter vereinzelter Hepatozyten wurden durch die Verwendung von Matrices als Kultursubstrat erzielt, wie z.B. Collagen I (Dunn *et al.*, 1991; Nakajima und Shimbara, 1996; Koebe *et al.*, 1994), Laminin (Bissel *et al.*, 1987; Hirata *et al.*, 1983), Matrigel (Brown *et al.*, 1995; Block *et al.*, 1996), Einbettung von Hepatozyten in Matrices (Bader *et al.*, 1994; Gomez-Lechon *et al.*, 1998) und zusätzlicher Kokultur mit feeder-Zellen (Bader *et al.*, 1996; Michalopoulos *et al.*, 1999), sowie natürlich durch die Optimierung (d.h. Imitation der *in vivo* Situation) der Mediumzusammensetzung bzw. Supplementierung des Mediums mit Insulin, Glukagon, Glukokortikoiden u.a. erlangt (Richman *et al.*, 1976; Sherrat *et al.*, 1989; Siddiqui *et al.*, 1999). Trotz der erreichten Optimierungen ist es bislang nicht gelungen, adulte Hepatozyten *in vitro* entsprechend zu vermehren, so daß größere Mengen Hepatozyten generiert werden, die leberspezifische Funktionen exprimieren. Bei dem erwünschten Einsatz humaner Hepatozyten für drug screening Modelle oder

im artifiziellen leberunterstützenden Bioreaktor ist dies jedoch unabdingbare Voraussetzung, da nicht auf eine unbegrenzte Anzahl humaner Hepatozyten zurückgegriffen werden kann. Hepatische Zelllinien, die seit den 60er Jahren etabliert wurden (Pitot *et al.*, 1964; Coon und Weiss 1969; Kaighn, 1971), sind in zweifacher Hinsicht kein geeigneter Ersatz für primäre Hepatozyten: im Bioreaktor oder in der Gentherapie sind sie bezüglich ihres onkogenen Potentials nicht geeignet; und generell weisen sie nicht das volle Spektrum leberspezifischer Funktionen auf. So produziert z.B. die Ratten Hepatomzelllinie H4II-E-C3 (Pitot *et al.*, 1964) etwa dreimal weniger Albumin und über zehnmal weniger Transferrin und Hämoexin als primäre Hepatozyten in Kultur (Ikawa und Shozen, 1990). Die humane Hepatoblastomzelllinie HepG2 zeigt keine Reaktion auf die als Arzneimittel eingesetzten Hemmer der Cholesterinsynthese CI-981, Pravastatin, Fluvastatin und BMY-21950 im Gegensatz zu Ergebnissen *in vivo* und an primären Hepatozyten der Ratte in Kultur (Shaw *et al.*, 1990).

Eine sinnvolle Alternative zur Kultur adulter Hepatozyten kann die Expansion embryonaler Hepatozyten aufgrund ihres erhöhten Potentials zur Proliferation darstellen (Curran *et al.*, 1993; Hamamoto *et al.*, 1999). So bestünde die Möglichkeit, größere Mengen primärer Hepatozyten zu gewinnen. Erste Isolationen wurden enzymatisch von Hommes *et al.*, 1971 durchgeführt. Hepatozyten aus Lebern von E18 Embryonen (d.h. 18 Tage nach Befruchtung der Eizelle) der Ratte wurden durch Entfernung des Calciums mittels EDTA und anschließend enzymatischen Verdau mit Lysozym gewonnen. Erste Kulturen embryonaler Hepatozyten im Monolayer erfolgten 1972 von Leffert und Paul, wobei E19 – 21 Hepatozyten der Ratte durch Verdau mit Collagenase gewonnen und in Plastikschalen kultiviert wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten Hepatozyten zeigten geringere Vitalitäten bei enzymatischen als bei mechanischen Aufschluß der Lebern. Bedingt wird dies sicherlich durch einen Angriff der Zellmembranen durch die eingesetzten Enzyme. Mechanische Isolation ist also vorteilhafter, kann jedoch nur bei Lebern aus frühen Entwicklungsstadien angewandt werden, da Hepatozyten aus Lebern späterer Entwicklungsstadien nicht mehr rein mechanisch aus ihrem Zellverband gelöst werden können.

In dieser Arbeit wurden embryonale Hepatozyten der Ratte im bislang kaum untersuchten Entwicklungsstadium E12 als Modell für das humane System isoliert

und kultiviert. Ziel war es, durch Optimierung von Isolationsmethoden und Kulturbedingungen, den Einfluß von Matrices und Mediensupplementen auf die Proliferation und Differenzierung zu untersuchen. Dabei kam auch ein Wachstumsfaktor, Thrombopoietin, zum Einsatz, der bislang nicht in der Kultur von Hepatozyten oder anderen primären Zellen eingesetzt wurde, außer von Thrombozyten oder ihren Vorläufern. Thrombopoietin ist essentiell notwendig für die Entwicklung und Proliferation von Megakariozyten und Thrombozyten. Dies wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen (de Sauvage *et al.*, 1994; Kaushansky *et al.*, 1994; Lok *et al.*, 1994; Wendling *et al.*, 1994; Ritchie *et al.*, 1997). Bekannt ist, daß die in der Embryonalentwicklung blutbildende Leber ab der 5. Woche in der Entwicklung des humanen Fötus (entricht ca. E 14 der Ratte) Thrombopoietin sekretiert (Murray *et al.*, 2000).

4.1 Expansion embryonaler Hepatozyten

Die in dieser Arbeit kultivierten Hepatozyten bildeten teilweise dreidimensionale Zellaggregate, daher wurde die Zahl der unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Hepatozyten durch Trypsinierung (zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Kultur) und anschließendem Auszählen ermittelt. So konnten konkrete Zahlen zur Zellvermehrung erhalten werden.

Eine von der Kulturunterlage abhängige Bildung von Zellaggregaten, auch Sphäroide genannt, wurde bei embryonalen Hepatozyten der Ratte von Hamamoto *et al.*, 1999 beobachtet. Dort wiesen Kulturen auf Collagen I ein flächiges, zweidimensionales Wachstum auf, wohingegen Kulturen auf Plastikoberflächen (Primaria, Becton Dickenson) dreidimensionale Sphäroide bildeten. Ein flächiges Wachstum auf Collagen I zeigte sich auch bei den hier kultivierten Hepatozyten; sphäroides Wachstum wurde bei Kultur auf feeder-Zellen und Laminin verstärkt beobachtet.

Die *in vivo* ermittelte durchschnittliche Zellvermehrung adulter Hepatozyten der Ratte nach 2/3 partieller Hepatektomie nimmt um das 1,7 fache zu (Fabrikant, 1969; Stöcker und Heine, 1971). Nach einer Woche ist das original Volumen der Leber wieder erreicht (Higgins und Anderson, 1931). *In vitro* konnten mitogene Effekte von Wachstumsfaktoren oder Supplementen nachgewiesen werden. So

konnten Richmann *et al.*, 1976 einen drastisch höheren Thymidin-Einbau (70,9 %) in Hepatozyten (isoliert aus adulten hepatektomierten Ratten) beobachten, wenn diese mit EGF (epidermal growth factor), Glukagon und Insulin wurden, im Gegensatz zu den Kontrollen (2,8 %). Ebenso führte die Kultur mit Zusatz von Insulin (11,4 %), EGF und Glukagon (25,4 %) oder EGF und Insulin (52,2 %) zu erhöhten Einbauraten. Mead und Fausto zeigten 1989 einen stärkeren mitogenen Effekt von TGFalpha (transforming growth factor alpha) als EGF sowohl *in vivo* (Anstieg der mRNA Produktion nach partieller Hepatektomie adulter Ratten) als auch *in vitro* (13facher Anstieg der DNA-Synthese). Brenner *et al.*, 1989 wiesen *in vitro* einen induktiven Effekt von TGFalpha auf die Protoonkogen Expression, einen Anstieg des Thymidineinbaus (verstärkt durch den Zusatz von Insulin und Glukagon) und ansteigende Raten von in die S-Phase eingehende Hepatozyten adulter Ratten nach. Ebenso wiesen Gruppuso *et al.*, 1994 stark erhöhte DNA-Syntheseraten durch den Zusatz von TGFalpha zu Kulturen von E19 und E21 Rattenhepatozyten nach. Michalopoulos *et al.*, 1984 und Nakamura *et al.*, 1984 entdeckten HGF (hepatocyte growth factor) als neuen Wachstumsfaktor, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mitogen wirkt und dessen Effekt durch Kombination mit Insulin und EGF erhöht werden kann. FGF, PDGF (platelet derived growth factor), Somatomedin, Thrombin und Transferrin zeigten keine mitogenen Effekte in Kultur adulter Hepatozyten (Nakamura *et al.*, 1984). Kan *et al.*, 1989, zeigten einen mitogenen Effekt von aFGF (acidic fibroblast growth factor) auf Kulturen adulter Hepatozyten, Zugabe von aFGF reduziert die von TGFbeta (transforming growth factor beta) inhibierte DNA-Synthese. Supplementierung mit EGF führte zur Erhöhung der DNA-Synthese. HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) wurde von Ito *et al.*, 1994 als Transkript in Hepatozyten entdeckt. Dabei zeigten Hepatozyten adulter Lebern geringe Konzentrationen, wohingegen nach partieller Hepatektomie die Konzentrationen stark anstiegen. In adulter Leberzellkultur konnte ein starker mitogener Effekt nachgewiesen werden.

Die Fähigkeit zur Proliferation von Hepatozyten in Kultur hängt stark vom Alter des Organismus ab. So waren DNA-Syntheseraten embryonaler Hepatozyten der Ratte aus dem Entwicklungsstadium E19 nach drei Tagen in Kultur ohne Wachstumsfaktoren zehnmal höher als die adulter Hepatozyten (Curran *et al.*, 1993) und die embryonaler Hepatozyten aus E19 nach 24 – 48 h in Kultur sechsmal höher als die embryonaler Hepatozyten aus E21 (Gruppuso *et al.*,

1997). Hamamoto *et al.*, 1999 wiesen ein kontinuierlich abnehmendes Proliferationspotential von Hepatozyten aus E15 bis postnatal 14 (d.h. 14 Tage nach der Geburt isoliert) nach. Es erscheint daher sinnvoll, Hepatozyten aus Lebern möglichst früher Entwicklungsstadien zu gewinnen, um Zellen mit hohem Proliferationspotential zu kultivieren. Die Leber als Organanlage ist in der Präparation frühestens ab E10 erkennbar und zu isolieren. Ab dem Entwicklungsstadium E14 beginnt das Einsetzen der Hematopoiese und die Differenzierung, bis dahin wird das stärkste Wachstum des Organs beobachtet sowie ein weitreichender Einfluß von Wachstumsfaktoren postuliert. Dies wird unterlegt durch Beobachtungen wie der letztlich letalen embryonalen Hepatogenese von Mäusen mit homozygoten Mutationen von: c-jun (Hilberg *et al.*, 1993), einem Streß und Mitogen aktivierbaren Transkriptionsfaktor (Karin *et al.*, 1997); Hlx (Hentsch *et al.*, 1996), einem Transkriptionsfaktor, der im Mesenchym um die Leberanlage exprimiert wird und über mehrere pathways Wachstumsfaktorgene induziert; HGF (Schmidt *et al.*, 1995), einem Wachstumsfaktor, der durch Bindung an und Aktivierung von seinem Rezeptor c-met die Induktion verschiedener Proliferationsgene bewirkt (Montesano *et al.*, 1991). Ebenso konnte in Teilorgankulturen früher Stadien der Maus gezeigt werden, daß EGF für die Entwicklung der Leberanlage nötig ist (Jung *et al.*, 1999). C-myc, ein Protoonkogen kodierend für Regulatoren der Transkription und Replikation (Kaddurah-Daouk *et al.*, 1987) und auch selber reguliert von Wachstumsfaktoren, erreicht sein Expressionsmaximum (in der Maus) bei E13 und fällt danach bis E15 stark ab (Schmid und Schulz, 1990).

Für maximale Proliferationsraten, auch mit Einsatz von Wachstumsfaktoren, erscheint daher ein Zeitrahmen von E10 bis E14 sinnvoll. Versuche wurden daher mit E12 Stadien durchgeführt. Auch für den experimentellen Einsatz des noch nicht in der Hepatozytenkultur eingesetzten Thrombopoietins, einem in der Entwicklung von Thrombozyten involvierten und von der fetalen und adulten Leber sekretierten Wachstumsfaktor (Qian, 1998; Jelkmann, 2001), stellte sich die Überlegung ein, die Auswirkungen auf die Proliferation von Hepatozyten zu untersuchen, die noch nicht mit der Hematopoiese *in vivo* begonnen haben. *In vitro* Untersuchungen zur Sekretion von TPO an Hepatozyten der Maus für 21 Tage in Kultur zeigten, daß weder Hepatozyten aus E13 noch E19 Thrombopoietin in das Medium abgeben (Zucali *et al.*, 1977). In Patienten mit Lebertumoren

(Hepatoblastomen) kann sehr häufig ein erhöhter Thrombopoietingehalt im Serum festgestellt werden (Nickerson *et al.*, 1980; Komura *et al.*, 1998), was eventuell auf einen Zusammenhang zwischen Thrombopoietin und Anregung zur vermehrten Zellteilung hindeuten könnte.

Neben Thrombopoietin wurden in dieser Arbeit in der Leberzellkultur bekannte Wachstumsfaktoren (20 ng/ml) einzeln oder in Kombination eingesetzt: HGF; EGF, TGF α ; TPO (10 und 20 ng/ml); HGF und EGF; HGF, EGF und TPO (10 ng/ml) ; HGF, EGF und TPO (20 ng/ml); HGF, EGF und TGF α ; TPO (20 ng/ml) und TGF α ; TPO (20 ng/ml) und HGF. Es zeigten sich abhängig von der Matrix optimale Kombinationen, wobei Ansätze mit Zusatz von TPO einzeln oder in Kombination stets zu maximalen Zellzahlen führten. Andere Wachstumsfaktoren/-kombinationen zeigten (abhängig von der Matrix) geringere Zellzahlen, aber meist höhere als Kontrollen ohne Wachstumsfaktorzusatz. So ergab die Kombination von HGF und TPO (20 ng/ml) höchste Zellzahlen in Kultur auf Matrices wie Laminin, Collagen IV und Matrigel. In Kultur auf Collagen I und den feeder-Zellen 3T3, MRC-5 und primären Fibroblasten führte die Supplementierung mit TPO allein (20 ng/ml) zur maximalen Zellzahl. Von den verschiedenen eingesetzten Beschichtungen erwiesen sich Collagen IV und Matrigel (extrahiert aus EHS-Tumoren, ein Gemisch aus Collagen IV, Laminin und Heparan Sulfat Proteoglycan) bezüglich der Proliferation als optimal. Nach 5 DIV (days *in vitro*) ergab sich eine Zellzahl von je etwa 140.000 Z/cm², d.h. eine siebenmal höhere Zellzahl als ausgesät wurde. Diese beiden Matrices als optimale für die Proliferation stehen im Gegensatz zu optimalen Beschichtungen bei Betrachtung der Differenzierungsmarker wie der Albuminproduktion. Dort sekretieren Hepatozyten auf Laminin und Collagen I (trotz geringerer Zellzahl) deutlich mehr Albumin als auf anderen Matrixproteinen. Dieser Befund steht in Kontrast zu Ergebnissen von Zheng *et al.*, 2000. Dort sekretierten fetale Hepatozyten der Maus in Kultur mit HGF nach 15 DIV 4,6 mal mehr Albumin auf Collagen IV als auf Laminin und 1,6 mal mehr als auf Collagen I. Diese Daten müssen jedoch eingeschränkt betrachtet werden, da keine Angaben zur Einheit noch ein Bezug zu Zellzahlen erfolgte.

In Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen Matrix *in vivo* und *in vitro* erscheint ein proliferativer Effekt von Collagen IV und ein differenzierender von Collagen I plausibel. Diese Ergebnisse werden unterstützt von Befunden zur

Matrixzusammensetzung *in vivo* in der adulten (Martinez-Hernandez, 1984) und sich entwickelnden Leber (Martinez-Hernandez und Amenta, 1993). Während der Hepatogenese ist der Anteil von Collagen I zu Beginn der Entwicklung minimal, es überwiegen Collagen IV, V und Laminin. Mit der weiteren Entwicklung wird der Anteil an Collagen I erhöht. Die Matrixzusammensetzung der adulten Leber unterscheidet sich stark von derjenigen der embryonalen. Bemerkenswert dabei ist auch die unterschiedliche graduelle Zusammensetzung der Matrix um die Hepatozyten entlang eines Gallenganges, die einhergeht mit veränderter gradueller Morphologie und Funktion der Hepatozyten (Reid *et al.*, 1992). So sind ausgehend vom portalen Trias kleine ovale Hepatozyten (Progenitoren) zu finden, deren Differenzierung in Richtung Zentralvene immer weiter zunimmt. Entsprechend ist die Zusammensetzung der Matrix ausgehend vom portalen Trias „embryonal“, d.h. Collagen IV, V und Laminin, übergehend zu Collagen III und IV sowie Fibronektin und schließlich bei terminal differenzierten Hepatozyten an der Zentralvene Collagen III, I und VI sowie Fibronektin.

Es kann also zwischen „embryonalen“ und „adulten“ Matrices unterschieden werden, die entsprechend einen proliferativen oder differenzierenden Einfluß auf die Hepatozyten ausüben. „Embryonale“ Matrices unterstützen also die Proliferation.

Einen stark unterschiedlichen Effekt auf die Anheftungseffektivität fetaler (E20/21) im Vergleich zu adulten Hepatozyten der Maus bei dem Einsatz von Laminin, Fibronektin und Collagen IV wurde von Hirata *et al.*, 1983 beobachtet. Dabei zeigte sich, daß Laminin die Anheftung von fetalen, nicht aber von adulten Hepatozyten, unterstützte. Im Gegensatz dazu unterstützte Fibronektin (isoliert aus der Maus) das Anheften adulter, aber nicht fetaler Hepatozyten. Ebenso war die DNA-Synthese und Proliferation auf Laminin fetaler Hepatozyten in Kultur höher als auf Collagen IV oder Fibronektin. Die Beobachtungen von Hirata *et al.*, 1983 stimmen mit den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen nicht überein, wobei das weitaus ältere Entwicklungsstadium der bei Hirata *et al.*, 1983 eingesetzten Hepatozyten beachtet werden muß.

Kulturen auf feeder-Zellen, insbesondere auf 3T3, proliferierten durch Zusatz von TPO stärker als Kulturen auf Matrices. Trotz weitaus höchsten Zellzahlen produzierten Hepatozyten auf 3T3 feeder-Zellen von allen feeder-Zellkulturen am wenigsten Albumin. Im Gegensatz dazu produzierten Hepatozyten auf MRC-5 am

meisten Albumin, wiesen aber von allen feeder-Zellkulturen die geringste Zellzahl auf. Kulturen auf MRC-5 wiesen mit höchster Albuminproduktion dennoch mehr Zellen auf als am stärksten proliferierende Kulturen auf Collagen IV.

Generell kann also festgestellt werden, daß Thrombopoietin einen stark mitogenen Effekt auf embryonale Hepatozyten früher Entwicklungsstadien hat. Es erscheint in dem Zusammenhang wichtig, Hepatozyten einzusetzen, die sich im Stadium vor Beginn der Blutbildung befinden, da Thrombopoietin als Wachstumsfaktor für Thrombozyten von den Hepatozyten selber etwa ab dem Entwicklungsstadium E14 sekretiert wird.

Proliferation und Differenzierung schließen sich zwar nicht aus (wie dies auch in der Immunocytochemie zu beobachten ist), es ist aber eine deutlich geringere Proliferation zu beobachten, wenn Differenzierungsmarker exprimiert werden.

Den auch hier beobachteten unterstützenden Effekt von feeder-Zellen in Kultur von adulten Hepatozyten wurde von Talbot *et al.*, 1994a, b durch den Einsatz von STO (embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus), sowie von Sato *et al.*, 1999 Hernandez *et al.* 1993 und De La Vega *et al.*, 1991 durch Einsatz von 3T3 beobachtet, der sich positiv auf Überlebensraten, Proteinsekretion und Entgiftungsleistung der Hepatozyten auswirkte. Langenbach *et al.*, 1979 kultivierten adulte Hepatozyten auf C3H/10T $\frac{1}{2}$ (embryonale Mausfibroblastenlinie), James *et al.*, 1992 auf nichtparenchymalen Epithelzellen, die aus Lebern nach partieller Hepatektomie gewonnen wurden. Es ist allgemein aber noch zu klären, ob dieser positive Effekt durch Zell-Zell-Kontakte, Sekretion von unterstützenden Faktoren (wie Wachstumsfaktoren) oder auch durch beide Faktoren zustande kommt. Sato *et al.*, 1992 identifizierten Pleiotrophin als von 3T3 feeder-Zellen sekretiertes Mitogen. Pleiotrophin wurde während der Regeneration nach partieller Hepatektomie in der adulten Leber nachgewiesen (Sato *et al.*, 1999).

4.2 Metabolische Kapazität

Ein wichtiger Parameter für die metabolische Kapazität von Leberzellen ist die Albuminsekretion, die *in vivo* im gesunden Organismus (Rothschild *et al.*, 1988) weitaus höher ist als bei Lebererkrankungen wie der Zirrhose oder Hepatitis (Annoni *et al.*, 1990). Albumin nimmt den Hauptanteil aller Serumproteine ein und

ist verantwortlich für die Osmoregulation und pH-Wert Stabilität des Blutes und fungiert als Konjugations- und Transportprotein für Xeno- und Endobiotika (Peters, 1975). Alpha-Fetoprotein stellt das Hauptserumprotein während der Embryonalentwicklung dar. In der Entwicklung der Ratte betragen die Verhältnisse AFP/Albumin zum frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung (E15) 2,0, zum Ende der Embryonalentwicklung (E19) 1,0. Ab diesem Zeitpunkt ist ein steter Abfall des Verhältnisses zu beobachten, der bis 14 Tage nach der Geburt bedingt ist durch eine gleichbleibende AFP Konzentration und wachsender Albuminkonzentration. Nach diesem Zeitpunkt (ab postnatal P14) nimmt der AFP-Gehalt schnell ab. In der Leber einer 50 Tage alten Ratte kann kein AFP mehr nachgewiesen werden, es ist nur noch Albumin vorhanden (Liao *et al.*, 1980). Beide Proteine besitzen ähnliche Proteinsequenzen. Es ist noch nicht vollständig geklärt, warum ein Wechsel von AFP zu Albumin während der Entwicklung stattfindet. Bekannt ist, daß AFP höhere Affinität zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren besitzt (Deutsch, 1991).

Im Vergleich von Albuminsekretionen auf der gleichen Matrix, aber mit und ohne Wachstumsfaktoren in Kultur produzierten Hepatozyten auf MRC-5, primären Fibroblasten und Collagen IV insgesamt deutlich weniger oder gleich viel (Matrigel) Albumin/cm² mit Wachstumsfaktoren (ca. 12; 10; 2,5 bzw. 2,5 µg/cm²) als ohne (ca. 60; 22; 4 bzw. 2,5 µg/cm²), obwohl in Kultur mit Wachstumsfaktoren mehr Zellen vorhanden waren. Hepatozyten auf 3T3, Laminin und Collagen I dagegen wiesen eine höhere Gesamtalbuminsekretion in Kultur mit Wachstumsfaktoren (ca. 7,5; 7 bzw. 5,5 µg/cm²) als in Kultur ohne Wachstumsfaktoren (ca. 2; 1,8 bzw. 1 µg/cm²) auf. Es herrscht also eine von dem Kultursubstrat abhängige Reaktion bezüglich des Wachstumsfaktorzusatzes, wobei auf den Substraten 3T3, Laminin und Collagen I im Vergleich zu anderen Kultursubstraten die erhöhte Proliferation zu keiner Verminderung der Albuminsekretion/Zelle führte (z.B. waren auf 3T3 1,5 mal mehr Hepatozyten/cm² nach 12 DIV mit Zusatz von Wachstumsfaktor vorhanden, die etwa 1,3 mal mehr Albumin/cm² als ohne Zusatz produzierten). Proliferation und Differenzierung (am Beispiel der Albuminproduktion) schließen sich mit geeigneter Matrix also nicht aus.

Generell muß bei der Beurteilung der Albuminproduktion ein Vergleich mit adulten Zellen angestrebt werden. Nur so kann beurteilt werden, ob die embryonalen

Hepatozyten sich als geeigneter Ersatz etablieren können. Die adulte Leber der Ratte produziert *in vivo* (während sie perfundiert wird) 12 mg Albumin pro g Leber und Tag (John und Miller, 1969). Geeigneter als Vergleich sind Daten aus Hepatozytenkulturen *in vitro*, wobei hier unterschiedliche Kultursubstrate und Medien einen Einfluß auf die Albuminsekretion haben. Ikawa und Shozen, 1990 maßen in Kultur auf Kunststoff und in Williams Medium E und Zusatz von 10 % FCS Albuminsekretionen adulter Hepatozyten der Ratte von $10,2 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ ($= 0,204 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$). Nakajima und Shimbara, 1996 wiesen auf Collagen I Sekretionen von ca. $35 \mu\text{g}/5 \cdot 10^5 \text{ Zellen}/7 \text{ d}$ ($= \text{ca. } 0,2 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) und auf Matrigel erniedrigte Konzentrationen von ca. $23 \mu\text{g}/5 \cdot 10^5 \text{ Zellen}/7 \text{ d}$ ($= \text{ca. } 0,13 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) nach. Vergleicht man diese Sekretionsraten mit denen der hier kultivierten embryonalen Hepatozyten, so wiesen nur die auf Proteinmatrizes ohne Wachstumsfaktorzusatz in Ansatz B, C und D kultivierten Zellen mit etwa $0,06 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ wesentlich geringere Raten auf. Hepatozyten auf 3T3 mit Wachstumsfaktorzusatz dagegen zeigten mit ca. $0,2 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$, auf MRC-5 mit $1,25 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ und auf primären Fibroblasten mit $0,9 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ (unter der Voraussetzung von 600.000 [3T3] bzw. 200.000 [MRC-5 und primäre Fibroblasten] Zellen/cm² ab 5 DIV) mindestens gleich hohe oder höhere Albuminsekretionsraten als adulte Zellen in Kultur. Beachtet werden muß, daß auf allen Kultursubstraten die Albuminsekretionsrate zu Beginn der Kultur (durchschnittlich bis 6 DIV) deutlich geringer ist und im Laufe der Kultur (bis 20 DIV) ihr Maximum erreicht. Vergleichende Daten mit Kulturen embryonaler Hepatozyten anderer Forschergruppen verdeutlichen, daß die hier kultivierten Hepatozyten sehr schnell ihren embryonalen, undifferenzierten Charakter verlieren (wie auch der in der Immunocytochemie mangelnde Nachweis von AFP schon nach 2 DIV darauf hindeutet). Embryonale und fötale Hepatozyten verschiedener Entwicklungsstadien der Ratte wurden von Yeoh *et al.*, 1979 auf Kunststoff in Minimal Essential Medium und 10% FCS 7 Tage kultiviert. Hepatozyten aus E12 und E13 produzierten ca. $1 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ ($= 0,02 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$), aus E14 und E15 ca. $5 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ ($= 0,1 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) und aus E19 ca. $50\text{-}75 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$ ($= 1\text{-}1,5 \mu\text{g}/20.000 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) Albumin. Auch hier zeigt sich, daß die in dieser Arbeit kultivierten Hepatozyten aus E12 wesentlich mehr Albumin sekretierten als dies von Yeoh *et al.*, 1979 gezeigt wurde.

Immuncytochemische Detektionen von Albumin stimmten in ihrer Qualität häufig nicht mit den gemessenen Albuminkonzentrationen überein. So wiesen Kulturen auf Ansatz A (einziger Ansatz ohne Rinderserum Albumin Zusatz) stärkere Albuminsekretionen als in den Ansätzen B, C und D (stets Albumin vorhanden) auf. Immuncytochemisch konnte bei Ansatz A im Gegenteil meist am wenigsten Albumin intrazellulär nachgewiesen werden. Man könnte daher vermuten, daß bei kaum vorhandenem Albumin im Medium jegliches produzierte Albumin aus der Zelle transportiert wird, wohingegen bei Vorhandensein von Albumin im Medium Albumin intrazellulär zurückgehalten bzw. gespeichert wird. Die Regulation der Albuminsynthese *in vivo* ist bislang noch nicht aufgeklärt, es gibt jedoch deutliche Hinweise auf einen feedback-Mechanismus (Pietrangelo und Shafritz, 1994), der die hier beobachteten Albuminsekretionsraten im Vergleich zu immuncytochemischen Detektionen erklären könnte. So wird durch die gesunde Leber stets eine konstante Konzentration von 3,5 – 4 g Albumin/dl im Plasma aufrecht erhalten, bei chronischem oder akutem Abfall des Albuminlevels im Serum bei bestimmten Erkrankungen steigt die hepatische Synthese von Albumin an (Tracht *et al.*, 1967; Andersen und Rossing, 1967; Katz *et al.*, 1967). Während der Leberperfusion wurde von Rothschild *et al.*, 1969 gezeigt, daß Zugabe von Albumin in das Perfusionsmedium zu einer Verringerung der Albuminproduktion führte. Auf der molekularbiologischen Seite gibt es zwei Hinweise auf einen feedback-Mechanismus. So legt eine 282 bp Sequenz oberhalb des Albumingens die Fähigkeit zur Antwort auf Veränderungen des kolloid osmotischen Druckes (der hauptsächlich durch Albumin aufrechterhalten wird) fest, die sogenannte CAT-Sequenz, dem Promoter/Reporter des Albumin Gens (Tsutsumi *et al.*, 1993; Pietrangelo und Shafritz, 1993). Ebenso wird HNF1a (hepatocyte nuclear transcription factor), eine leberspezifischer Transkriptionsfaktor, der direkt die Albumintranskription unterstützt, in seiner Fähigkeit, seine Erkennungssequenz zu erkennen, direkt vom kolloid osmotischen Druck beeinflusst. Zusätzlich wird die Expression der HNF1a mRNA selber durch den kolloid osmotischen Druck reguliert (Pietrangelo und Shafritz, 1993).

Es stellt sich also die Frage, ob die immuncytochemische Detektion von Serumproteinen (nicht von Enzymen wie der Glutathion-S-Transferase oder den Cytochrom-P450 Enzymen, welche nicht sekretiert werden) die *in vitro* Situation ausreichend erfassen kann. Rückschließend auf die Markierung von AFP muß

daher in Erwägung gezogen werden, daß die nicht vorhandene Markierung zwei Ursachen haben kann: die Hepatozyten sind schon stark differenziert und werden daher nicht markiert, was unterstützt wird durch das Auftreten anderer Differenzierungsmarker wie der GST, CYP-Aktivität und immunocytochemische Markierung der CYP-Enzyme sowie Albuminsekretion. Oder die AFP-Sekretion verhält sich ähnlich der Albuminsekretion, es wird also AFP sekretiert, da im Medium keines vorhanden ist (feedback-Mechanismus), intrazellulär läßt sich daher kein AFP nachweisen. Letztlich kann diese Entscheidung durch Messung der AFP Konzentration im Überstand geklärt werden.

Neben der Albuminsekretion ist die Aktivität des Cytochrom-P450 Systems ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Hepatozyten in Kultur. Die Leber *in vivo* enthält ein breites Spektrum an Enzymen, die für die Oxidation und Reduktion (= Phase I der Entgiftung) von toxischen endo- und exogenen Substanzen zuständig sind (Ziegler, 1994; Lewis, 1996). Die Enzyme des Cytochrom-P450 Systems (CYP) sind Monooxygenasen und werden speziesspezifisch exprimiert (Lewis, 1996, Donato *et al.*, 1999).

In der Kultur von Hepatozyten ist der rasche Abfall von Cytochrom-P450 Aktivitäten, Enzymmengen und mRNA Konzentrationen eine bekannte Tatsache, der durch Optimierung der Kulturbedingungen entgegengewirkt werden soll (Guzelian *et al.*, 1977; Sirica und Pitot, 1979; Thurman und Kauffman, 1980; Woodcroft und Novak, 1998).

Es zeigte sich hier in der Kultur embryonaler Hepatozyten, daß mit Wachstumsfaktoren versetzte Ansätze generell geringere Aktivitäten (PROD, ECOD und EROD, stellvertretend für CYP2B1/2, 3A und 1A1/2) pro Zelle aufwiesen als Ansätze ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren, unabhängig von der verwendeten Kulturunterlage. Dieser Effekt von Wachstumsfaktoren auf das Cytochrom-P450 System wurde ähnlich von Block *et al.*, 1996 beobachtet. Adulte Hepatozyten der Ratten verloren in Kultur durch den Zusatz von HGF, EGF und/oder TGF α die Expression von CYP2B1 mRNA. Hohne *et al.*, 1990 wiesen eine komplette Blockierung der CYP1A1 Genexpression in adulten Hepatozyten der Maus durch den Zusatz von EGF oder TGF α nach. Aubrecht *et al.*, 1995 detektierten durch diese beiden Wachstumsfaktoren eine Inhibierung der CYP2B1 (PROD) Aktivität und Proteinexpression. Garcia *et al.*, 2001 zeigten einen Abfall

der Expression von CYP2C12 und CYP2A1 in Kulturen von Hepatozyten der Ratte verursacht durch EGF. Ching *et al.*, 1996 die Suppression von CYP2C11 mRNA ebenfalls durch den Zusatz von EGF. Bestimmte Wachstumsfaktoren reduzieren also die CYP Aktivität/Expression, dies kann auch bei den hier kultivierten Hepatozyten mit Zusatz von Thrombopoietin bzw. Thrombopoietin und HGF bei Vergleich der Zellzahlen auf verschiedenen Kulturunterlagen beobachtet werden. Die EROD-Aktivität (CYP1A1/2) der auf Matrix und feeder-Zellen kultivierten Hepatozyten waren bei den am stärksten proliferierenden Ansätzen, also Hepatozyten auf Collagen IV und auf 3T3, jeweils am geringsten. Hier bedingt also die durch Wachstumsfaktoren hervorgerufene verstärkte Proliferation eine Verminderung des Differenzierungsmerkmals EROD-Aktivität. Dies tritt nicht so deutlich bei einem Vergleich der PROD-Aktivitäten (CYP2B1/2) zwischen den einzelnen Kulturunterlagen hervor. Generell zeigten hier wie schon erwähnt Ansätze mit Wachstumsfaktoren geringere Aktivitäten pro Zelle als Ansätze ohne Wachstumsfaktoren. Die auf Proteinmatrix am stärksten proliferierenden Hepatozyten auf Collagen IV wiesen jedoch gleich hohe Aktivitäten auf wie auf anderen Matrices. Deutlich ist dies auch bei Kulturen auf feeder-Zellen zu erkennen, die am stärksten proliferierenden Hepatozyten auf 3T3 besaßen sogar höhere Aktivitäten als Hepatozyten auf MRC-5 oder primären Fibroblasten. EROD Aktivitäten sind in nahezu keinem Ansatz nachzuweisen, lediglich Kulturen auf 3T3 ohne Wachstumsfaktorzusatz weisen geringe Aktivitäten nach 2 DIV auf. Vergleiche zu Enzymaktivitäten adulter Hepatozyten der Ratte in Kultur ergeben ähnlich hohe EROD Aktivitäten bei Ansätzen ohne Wachstumsfaktoren auf Laminin, Matrigel und feeder-Zellen. So maßen Donato *et al.*, 1993 umgerechnet etwa 1,7 μM Substratumsatz pro 20.000 Zellen in einer Stunde nach drei Tagen in Kultur, deutlich weniger setzten nur Kulturen auf Collagen IV und I um, die nach 2 DIV etwa ein zehntel der Menge umsetzten. Die von Donato *et al.*, 1993 auf Fibronectin kultivierten Zellen reduzierten die EROD Aktivität sichtbar nach 5 DIV auf etwa 1,2 $\mu\text{M}/20.000 \text{ Z/h}$. Gemessene PROD Aktivitäten waren um etwa ein drittel niedriger, was sich hier im Verlauf der Kultur, jedoch nicht zu Beginn, bestätigt. EROD Aktivitäten von Hepatozyten der Ratte in Kultur werden von Donato *et al.*, 1999 bezogen auf Gesamtzellprotein angegeben, können aber im Verhältnis zu EROD Aktivitäten verglichen werden, da gleiche Ergebnisse und Kulturbedingungen für EROD Aktivitäten in Donato *et al.*, 1993 angegeben

werden. Demzufolge waren ECOD Aktivitäten über viermal höher als EROD Aktivitäten. Diese Beobachtungen treffen auf die hier kultivierten embryonalen Hepatozyten nicht zu.

Ein positiver Einfluß von feeder-Zellen auf PROD und EROD Aktivitäten konnte von Donato *et al.*, 1994 nachgewiesen werden. Adulte Hepatozyten der Ratte wurden entweder auf Fibronektin oder auf einer Zelllinie, die aus Nieren von Affen etabliert wurde, kultiviert. Nach drei Tagen in Kultur waren die Aktivitäten in Kultur auf feeder-Zellen 1,4 mal (EROD) bzw. 2,3 mal (PROD) höher als in Kultur auf Fibronektin. Dies trifft bei den embryonalen Hepatozyten nach 2 DIV in wachstumsfaktorfreier Kultur bei EROD Aktivitäten pro Zelle auf primären Fibroblasten und MRC-5, aber nicht auf 3T3 zu. PROD Aktivitäten pro Zelle sind auf Beschichtungen höher.

Ein wichtiges Enzym der Konjugation von Endo- und Xenobiotika in der Leber (= Phase II der Entgiftung) ist die Glutathion-S-Transferase (GST) (Habig *et al.*, 1974; Jakoby und Habig, 1980; Jakoby, 1994). Unter physiologischen Bedingungen reagiert das Tripeptid Glutathion (L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) spontan mit elektrophilen Carbonen, um letztlich ein Thiol zu formen, welches methyliert wird und mit dem Urin ausgeschieden werden kann. Mit Hilfe der GST wird die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch drastisch erhöht (Jakoby, 1978; Mannervik und Danielson, 1988).

In Kultur adulter Hepatozyten der Ratte konnte über einen gemessenen Versuchszeitraum von 7 Tagen nahezu konstant GST immuncytochemisch nachgewiesen werden. Immuncytochemie mit Antikörpern gegen die GST-Ya Untereinheit (wie auch hier verwendet) ergab über einen untersuchten Zeitraum von 6 Tagen positive Detektionen (Asakura *et al.*, 1993). GST Aktivitäten adulter Hepatozyten in Kultur (Asakura *et al.*, 1993) sind etwa dreimal höher als die embryonaler Hepatozyten aus Entwicklungsstadien E16-21 (Sherratt *et al.*, 1990). Die hier immuncytochemisch nachgewiesene GST ist in ihrer Expression deutlich abhängig von dem verwendeten Medium und der Kulturunterlage. So war die Expressionsstärke nach 12 Tagen in Kultur im Ansatz D (ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren in Williams Medium E mit 5% FCS) meist deutlich schwächer als in den Ansätzen A-C, was auf einen negativen Effekt bedingt durch Serumzusatz vermuten läßt (A: 48h Williams Medium E mit 5% FCS, danach

serumfrei; B: 24h Williams Medium E mit 5% FCS, danach serumfrei in DIF-Medium; C: 48h Williams Medium E mit 5% FCS, danach serumfrei in DIF-Medium). Im Ansatz B war die GST nach 12 Tagen in Kultur auf feeder-Zellen weitaus deutlicher exprimiert als auf Proteinmatrizes. Ein Vergleich von Kulturen mit und ohne (Ansatz B) Zusatz von Wachstumsfaktoren zeigte keine Verminderung der GST Expression in proliferierenden Hepatozyten, Kulturen auf Laminin oder Matrigel wiesen mit Wachstumsfaktorzusatz nach 5 Tagen in Kultur sogar stärkere Fluoreszenzen auf.

Die Leber ist das zentrale Organ des Energiestoffwechsels. Sie erhält von anderen Organen bzw. Muskeln und Fettgewebe Metabolite, wie Fettsäuren, Laktat, Aminosäuren u.a.. Im Gegenzug gibt sie zwei Metabolite ab, die zur Versorgung der restlichen Körpers dienen: Glukose und Acetoacetat (Seifter und Englard, 1994). In der Regulation eines konstanten Blutglukosespiegels spielen die beiden Hormone der Bauchspeicheldrüse, Insulin und Glukagon, die wichtigste Rolle (siehe Einleitung). Durch den Zusatz von Insulin und Glukagon in das Kulturmedium von Hepatozyten *in vitro* können leberspezifische Funktionen erhalten bleiben (Richman *et al.*, 1976; McGowan *et al.*, 1981).

Bei den hier kultivierten embryonalen Hepatozyten konnte ein Umsatz von Laktat und Glukose festgestellt werden, der abhängig ist von der Art des Mediums, des Kultursubstrates und des Zusatzes von Wachstumsfaktoren. So ergab sich ein Glukoseverbrauch bei Kulturen auf feeder-Zellen in allen Medien A-D ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Kulturen auf Proteinmatrizes dagegen verbrauchen Glukose nur bei Kultur mit Medien A und D (WE ohne bzw. mit 5% FCS), geben dagegen mit Medium B und C (DIF ohne FCS nach 24 bzw. 48h) Glukose in das Medium ab. Dieser mediumabhängige Effekt des Glukoseverbrauchs ist nicht bedingt durch variierende Insulin-, Glukagon- oder Dexamethason-Konzentrationen, da sowohl in Medien WE als auch in DIF gleich hohe Konzentrationen eingestellt sind. Auffällig dabei ist, daß nicht das Medium mit der höheren Glukosekonzentration an sich, nämlich DIF, zu einem Verbrauch von Glukose führt, wie es von Regulationsmechanismen *in vivo* und *in vitro* zu erwarten wäre. Für adulte Hepatozyten der Ratte in Kultur konnte gezeigt werden, daß ansteigende Konzentrationen von Glukose im Medium zu einer ansteigenden Aktivierung der Glycogensynthese führt (Cadefau *et al.*, 1997). Die Abgabe von

Laktat hingegen ist auf Proteinmatrizes unabhängig vom Medium, jedoch auf feeder-Zellen mediumabhängig. Zellen in Medienansätzen A und D gaben hier kaum Laktat in das Medium ab oder verbrauchten sogar etwas. In Medienansätzen B und C wurde jedoch sehr viel Laktat produziert (auf primären Fibroblasten deutlich weniger als auf MRC-5 und 3T3). Der Zusatz von Wachstumsfaktoren hatte keinen Einfluß auf die Laktatsekretion, dies trifft auf Kulturen auf Proteinmatrizes genauso zu wie auf Kulturen auf feeder-Zellen. Auf die Glukoseverwertung hat der Zusatz von Wachstumsfaktoren jedoch eine vom Kultursubstrat abhängige Auswirkung. Wie erwähnt, gaben Kulturen auf Proteinmatrizes Glukose in das Medium ab, Hepatozyten auf feeder-Zellen verbrauchten die Glukose. Zusatz von Wachstumsfaktoren führte auch bei Hepatozyten auf Proteinmatrizes zu einem Verbrauch von Glukose. Es kann daher festgestellt werden, daß proliferierende embryonale Hepatozyten Glukose verbrauchen.

Für adulte Hepatozyten *in vivo* ist Glukose nicht der primäre Energielieferant, sondern Ketosäuren, die aus dem Abbau von Aminosäuren stammen (Stryer, 1994). Die Leber versorgt Muskeln und Gehirn mit Glukose und ist für die Aufrechterhaltung des optimalen Glukosespiegels zuständig. Dieser geringe Verbrauch von Glukose konnte auch für adulte Hepatozyten der Ratte in Kultur nachgewiesen werden (Bissell *et al.*, 1978). Es ist aber auch anzunehmen, daß embryonale, nicht differenzierte Hepatozyten nicht entsprechend wie adulte Zellen Glukose verbrauchen oder abgeben. Dies wurde für die fetale Leber *in vivo* gezeigt, die nahezu keine Glukoneogenese und sehr wenig Glykogenspeicherung aufweist (Ballard und Hanson, 1967). Fetale Lebern beginnen erst um den Zeitpunkt der Geburt, Glukose und Glycogen zu synthetisieren (Ballard und Oliver, 1963; 1965). Einen weiteren Hinweis darauf geben Untersuchungen *in vitro*, in denen fetale Hepatozyten trotz hoher induzierter Insulinkonzentrationen nicht die Expression des Insulinrezeptors reprimierten (Neufeld *et al.*, 1980; Vinicor und Kiedrowski, 1982). Die hier kultivierten Hepatozyten sind also in Kultur schon zu einem frühen Zeitpunkt relativ differenziert.

4.3 Analyse der Genexpression

Nach etwa 10 Jahren Entwicklungsdauer (Fodor *et al.*, 1991; Maskos und Southern, 1992) haben sich DNA-Microarrays als Methode zur Expressionsanalyse im Hochdurchsatz (Skena *et al.*, 1995) etabliert. Die Vorteile gegenüber den traditionellen, in den 70er Jahren entwickelten Verfahren wie Hybridisierungen auf Nitrocellulose oder Nylon Membranen sind folgende (Skena und Davis, 1999):

Die nicht poröse Oberfläche der beschichteten Glasslides erlaubt den Einsatz geringster Mengen von zu untersuchender Probe, ebenso werden weder Probe noch Reagenzien an die Trägermatrix adsorbiert. Geringste Probenvolumen ermöglichen hohe Probenkonzentrationen mit schneller Hybridisierungskinetik. Durch die Zweidimensionalität werden replizierbare Daten erreicht.

Im Zusammenhang mit Hepatozyten wurden DNA-Microarrays bislang bei der Untersuchung von Hepatokarzinomen und anderen Lebererkrankungen wie Hepatitis (Lau *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001; Okabe *et al.*, 2001; Shirota *et al.*, 2001; Tackels-Horne *et al.*, 2001), permanenten hepatischen Zelllinien wie HepG2 oder Hep3B (Burczynski *et al.*, 2000; Puga *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2001; Khaoustov *et al.*, 2001; Scandurro *et al.*, 2001) und adulten Hepatozyten der Ratte in Kultur (Baker *et al.*, 2001) eingesetzt. Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurde die Veränderung der Genexpression z.B. zwischen gesundem und tumorösem Gewebe oder der Einfluß von karzinogenen Agenzien, von Schwerelosigkeit sowie von der Kulturdauer untersucht. DNA-Microarrays wurden bislang weder für die Untersuchung der Veränderung der Genexpression während der Organogenese, d.h. vergleichende Untersuchungen zwischen embryonalen, fetalen und adulten Hepatozyten, noch für den Einfluß von Wachstumsfaktoren *in vitro* auf primäre Zellen eingesetzt. Gerade hier kann jedoch mittels der Möglichkeit, die Expression vieler Gene gleichzeitig zu untersuchen, ein wichtiger Beitrag zum Verständnis über die komplizierten Abläufe während der Organentwicklung sowie der Wirkungsweise von Wachstumsfaktoren und auch der Einfluß von Matrices auf Proliferation und Differenzierung geleistet werden.

Generell besteht bei der vergleichenden Analyse zu Daten anderer Arbeitsgruppen das Problem der Inkompatibilität (Hoheisel *et al.*, 2001). Dies liegt

nicht nur in der Verwendung unterschiedlicher Systeme, sondern in einer Vielzahl variierender Komponenten der einzelnen Experimente begründet. Dabei spielen folgende Parameter eine Rolle:

- bei der Herstellung des Microarrays die Auswahl der Oligonukleotidsequenzen, des Objektträgers und seiner Beschichtung
- das Spotting des Microarrays und die Nachbehandlung
- die Art der Probengewinnung
- die Konzentration der aufgetragenen RNA
- die cDNA-Synthese
- das Markierungssystem und eine evtl. Amplifikation
- bei der Bild- und Datenanalyse die Art des Scanners, der Bearbeitungssoftware, der Datenanalyse
- und letztlich die Art der Datenauswertung

Vergleichende Aussagen zu den bisher einzigen Daten primärer adulter Hepatozyten der Ratte *in vivo* und *in vitro* (Baker *et al.*, 2001) zu den hier gefundenen Ergebnissen können daher nur bedingt und anhand von relativen Veränderungen von Verhältnissen getroffen werden. Ein Vergleich absoluter Meßwerte kann nicht stattfinden. So zeigte sich bei den von Baker *et al.*, 2001 auf unbeschichteten Zellkulturschalen, in supplementiertem WE kultivierten Hepatozyten im Verlauf der Kultur von 72h eine Repression der Cytochrom P450 und bestimmter Phase-2 Enzyme (Sulfatasen), jedoch eine Überexpression der Glucuronidasen (Phase-2 Enzyme), Proteine der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts.

Ein Vergleich der Expression der untersuchten Gene von Hepatozyten aus adulter Leber mit denen aus embryonaler Leber (E12) zeigte eine grundlegende Veränderung in der Stärke der Transkription. Die hier mittels DNA-Microarray aufgezeigten Veränderungen in der Expressionsstärke können mit Daten (von Proteinmessungen oder Northern-Blot) aus der Literatur verglichen werden. Somit kann beurteilt werden, ob die mit Hilfe der Chip-Technologie gewonnenen Daten bereits bekannten Veränderungen zwischen embryonaler und adulter Leber entsprechen. Als wichtigstes Merkmal erweisen sich dabei die Serumproteine. AFP ist das fetale Serumprotein, dessen Konzentration bis einige Tage postnatal sehr stark abnimmt und im adulten Organismus kaum nachzuweisen ist (Nayak und Mital, 1977). Albumin, Transferrin und Transthyretin sind die dominanten

adulten Serumproteine, ihre Konzentration nimmt im Laufe der Organogenese immer weiter zu (Liao *et al.*, 1980; Yeoh und Morgan, 1974; Moorman *et al.*, 1990). Diese Beobachtungen stimmen mit den hier erzielten Ergebnissen überein, das Gen von Albumin wird 2,6fach, Transthyretin 5,1fach und Transferrin sogar 11fach stärker transkribiert. Untersuchungen über die Expression des EGF-Rezeptors an der Membran zeigten, daß diese ab E16 bis E18 erfolgt und danach konstant zunimmt (Feracci, *et al.*, 1987). In den hier gewonnenen Daten zeigte sich auch hier eine 2,7fach höhere Expression in der adulten als in der embryonalen Leber.

Bei den hier untersuchten Expressionsprofilen konnte ein weitreichender Einfluß von benutzter Kulturmatrix und Zusatz von Wachstumsfaktoren auf die Intensität der Expression einzelner Gene festgestellt werden. Dabei hängt der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Art und Stärke der Genregulation ganz wesentlich von der jeweiligen Matrix ab, führt also bei den drei benutzten Matrices zu einer jeweils ganz anderen Veränderung der Genexpression. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß Kulturen auf Collagen IV mit TPO und HGF, Kulturen auf Collagen I und 3T3 nur mit TPO kultiviert wurden. Der Einfluß durch Zugabe von Wachstumsfaktoren auf die Änderung der Genexpression ist dabei nicht so markant wie der durch die Kultur auf verschiedenen Matrices.

So führte die Kultur auf „embryonaler“ Matrix Collagen IV zu einer drastischen Verminderung nahezu aller Intensitäten der Genexpression, insbesondere der Cytochrome, im Verhältnis zu embryonalen Lebern (E12). Ein Vergleich zu adulten Lebern weist eine markante Verminderung der Intensitäten auf, wobei auffälligerweise Kulturen auf Collagen IV auch den embryonalen Marker Alpha Fetoprotein (AFP) über zehnfach geringer exprimieren als embryonale Lebern. Die auf Collagen IV kultivierten Hepatozyten weisen also weder einen differenzierten Charakter auf (verdeutlicht durch eine Erhöhung der Expression von z.B. Cytochromen oder adulten Serumproteinen), noch einen embryonalen (wie AFP). Wie in adulten Hepatozyten ist jedoch die Expression der Cytochrom Oxidase auffällig vermindert. Die Kultur mit Wachstumsfaktoren (HGF und TPO) führt hier fast nur zu einer Hochregulation der Akutphaseproteine und nicht wie erwartet auch der Protooncogene, vor allem c-met, welches den Rezeptor für HGF kodiert (Naldini *et al.*, 1991). Untersuchungen von de Juan *et al.*, 1994 zeigten jedoch, daß die Aktivierung von c-met in den ersten 24h Stunden nach Zugabe in Kultur

erfolgt und die Expression nach 48h auf das initiale Level absinkt. Ähnliches trifft auch auf STAT-3 (leberspezifischer Transkriptionsfaktor) zu, die Induktion der Transkription erfolgt 7h nach Zugabe von HGF und sinkt nach 28h auf normales Niveau ab (Schaper *et al.*, 1997). Die hier nach 5 Tagen in Kultur untersuchte Genexpression kann demzufolge nicht mehr eine Erhöhung durch den Einfluß bestimmter Wachstumsfaktoren auf spezifische Gene nachweisen.

Kultur auf „adulter“ Matrix Collagen I führt zu einer markanten Hochregulation der meisten untersuchten Gene, insbesondere jener, die mit Differenzierung assoziiert werden können. So erhöht sich die Expression leberspezifischer Transkriptionsfaktoren (HNF-1, -4, STAT 3, 5b), die als Promotor bzw. Enhancer die Transkription leberspezifischer Proteine unterstützen, wie z.B. die des Albumins (Runge *et al.*, 1998; Thomassin *et al.*, 1996; Zaret, 1994). AFP als embryonaler Marker bleibt in seiner Expression unverändert. Die auffällig starke, sogar enorm höhere Überexpression der Akutphaseproteine im Vergleich mit adulten Lebern, hat vermutlich seine Ursache in der Rolle, die Collagen I in der zirrhotischen Leber spielt. So weist die zhirrotische Leber einen signifikant höheren Anteil an Collagen I auf (Seyer *et al.*, 1977). Möglich wäre daher, daß aufgrund der ausschließlich aus Collagen I bestehenden Beschichtung (nicht der *in vivo* Situation entsprechend, in der eine Vielzahl verschiedener Matrixproteine und der Kontakt zu angrenzenden Zellen vorliegen) es durch den nur aus Collagen I bestehenden Kontakt zu einem Signal der krankhaften Veränderung kommt. Hepatozyten könnten als Folge davon vermehrt Akutphaseproteine exprimieren. Als Folge einer vermehrten Expression u.a. der Akutphaseproteine könnte auch die, besonders im Vergleich zu adulten Lebern und anderen Kulturansätzen auffallende, Hochregulation der Enzyme des Energiestoffwechsels gedeutet werden. Die in der ATP-Synthese involvierte mitochondriale Cytochrom Oxidase überträgt Elektronen auf Sauerstoff und transportiert Protonen über die mitochondriale Membran (Babcock und Wikström, 1992). Die vermehrte Synthese von Proteinen benötigt einen erhöhten ATP Bedarf, dies könnte die Zelle durch eine Erhöhung des Gehaltes an Cytochrom Oxidase versuchen zu unterstützen. Die auf 3T3 feeder-Zellen kultivierten Hepatozyten weisen ein auffallend ähnliches Expressionsprofil zu dem adulter Lebern auf. Deutlich erhöht dagegen im Vergleich zu adulten Lebern und den anderen Kulturansätzen auf Collagen I und IV ist die Expression des Cyclins, eines zyklisch exprimierten Proteins der Mitose

(Hunt *et al.*; 1992). Die beobachtete Erhöhung steht im Einklang mit der auf 3T3 verstärkt beobachteten Zellteilung. Ebenso weist die Kultur auf 3T3 feeder-Zellen mit Zusatz von TPO eine zu embryonalen Hepatozyten doppelt so hohe Expression des NTAK auf. Kulturen auf Collagen I und IV mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren sowie Kulturen auf 3T3 ohne Zusatz von TPO weisen im Verhältnis zu embryonalen Hepatozyten eine verringerte Expression des NTAK auf. Die beobachtete Verdopplung der Expression des NTAK von embryonalen Hepatozyten auf 3T3 mit Zusatz von TPO ähnelt derjenigen der adulten Leber (1,4fach). NTAK ist ein neu entdeckter Wachstumsfaktor der EGF-Familie, der an die Zelloberflächenrezeptoren Erb-B3 und 4, nicht aber 1 und 2 bindet (Higashiyama *et al.*, 1997, Yamada *et al.*, 2000). In allen anderen Kulturansätzen wie auch der Kultur auf 3T3 ohne Zusatz von TPO ist die Expression des NTAK deutlich reduziert. Es ist daher zu vermuten, daß NTAK mitverantwortlich ist für die auf 3T3-feeder-Zellen mit Zusatz von TPO beobachtete maximale Proliferation aller Ansätze. Dabei muß aber ein Zusammenspiel von dem Kontakt zu den feeder-Zellen oder von ihnen produzierten Substanzen sowie TPO vorliegen. TPO allein kann nicht die erhöhte Proliferation verantwortlich sein, wie die Kulturansätze auf Collagen I und IV beweisen. Dort führt der Zusatz von TPO nur zu einer 1,5fach stärkeren, von einer 5,7fach auf 3,8fach verringerten NTAK Expression (Collagen I), bzw. in Kombination mit HGF zu einer 2,6fach geringeren Expression.

Ein positiver Einfluß von feeder-Zellen auf Proliferation und Langzeitkultivierbarkeit wurde für die Kultur verschiedenster Zellarten beobachtet. Dabei scheint die Art der verwendeten feeder-Zellart von großer Bedeutung zu sein, wie hier am Beispiel anderer benutzter feeder-Zellen (MRC-5, primäre Fibroblasten) gezeigt werden konnte. Der Zell-Zell Kontakt und/oder von den feeder-Zellen sekretierte Substanzen (Sato *et al.*, 1999) scheinen also die *in vivo* Situation in der adulten Leber zu imitieren und essentiell zur vollständigen Leberdifferenzierung nötig zu sein sowie die Proliferation zu unterstützen.

Eine wichtige Fragestellung bei der Untersuchung der Genexpressionsprofile war, in wieweit kultivierte embryonale Zellen den adulten Hepatozyten gleichen und somit einen äquivalenten Ersatz, z.B. für den Einsatz im Bioreaktor oder als pharmakologisches Testsystem, darstellen. Die Kultur auf 3T3 feeder-Zellen mit Zusatz von Thrombopoietin führte zu einer starken Vermehrung der Zellzahl, die

kultivierten Hepatozyten wiesen nach 5 DIV ein den adulter Lebern sehr ähnelndes Expressionsprofil auf. Somit kann diese Form der Kultur als äquivalentes Modell angesehen werden.

Ein weiterer Aspekt der DNA-Mikroarray Untersuchungen ist, ob sich die Ergebnisse von *in vitro* Tests spezifischer Leberfunktionen (wie Albuminproduktion, Cytochrom-P450-Aktivität, immuncytochemische Detektion verschiedener Proteine) im Expressionsprofil widerspiegeln. Denn es ist zu bedenken, daß das Profil der Genexpression nicht den letztlichen Zustand der Zelle darstellt. Posttranskriptionale Prozesse wie das Prozessieren der mRNA, ihre Stabilität und Translation sowie das Prozessieren des Proteins, seine Sekretion, Stabilität und Aktivierung stellen Schritte dar, die zwischen dem Expressionsprofil und dem aktiven Protein liegen. Es konnte festgestellt werden, daß die im Expressionsprofil ermittelten Intensitäten der RNA-Transkription im Verhältnis der einzelnen Kulturansätze nicht immer denjenigen der durch Proteinsekretionsmessungen, Enzymaktivitätsmessungen oder Immuncytochemie gemessenen Verhältnisse entsprechen. Am Beispiel der Albuminmessung kann dies verdeutlicht werden: Am Tag 5 in Kultur exprimieren Hepatozyten auf 3T3 mit Zusatz von Wachstumsfaktor von den insgesamt 6 untersuchten Kulturansätzen die geringste Menge Albumin RNA. Die produzierte Albuminkonzentration im Zeitraum von 2-5 DIV ist mit $0,26 \cdot 10^{-6}$ µg/Zelle von den untersuchten Kulturansätzen ebenfalls die geringste. Immuncytochemische Markierung des intrazellulären Albumins von Hepatozyten auf 3T3 mit Zusatz von Wachstumsfaktor dagegen weist von allen Ansätzen die stärkste Markierung auf. Es ist daher wie schon erwähnt zu vermuten, daß Albumin intrazellulär akkumuliert und nicht sekretiert wird, durch feedback-Mechanismus wird die Transkription reduziert. Immuncytochemisch nach 5 DIV in allen Kulturansätzen nicht zu detektierendes Alpha Fetoprotein war entsprechend im Expressionsprofil durch DNA-Microarray im Vergleich zu embryonalen Lebern markant reduziert und kaum nachweisbar. Es wird also weder das Gen für AFP transkribiert, noch liegt AFP intrazellulär vor.

Untersuchungen mit Hilfe der DNA-Microarray Technologie sind daher ein wertvolles Hilfsmittel in der Zellkultur, um den Zustand der Kultur zu charakterisieren. Das Expressionsprofil spiegelt sich meist in Untersuchungen leberspezifischer Funktionen wider. Um einen detaillierten Einblick von der RNA

Transkription bis zur Proteinsekretion und des physiologischen Zustandes der Zelle zu gewinnen, sollten Beurteilungen des Genexpressionsprofils stets durch Proteinkonzentrations- und Aktivitätsmessungen unterstützt werden. Diese umfassende Analyse „vom Gen bis zum Protein“, die auch als functional Genomics bezeichnet wird, wurde in dieser Arbeit erstmalig in der Kultur von Hepatozyten realisiert.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde *in vitro* die Proliferation und Differenzierung embryonaler Hepatozyten untersucht. Am Modell der Ratte wurden daher die Kulturbedingungen embryonaler Hepatozyten variiert und optimiert. Mit Hilfe von Analysen sowohl auf genomischer als auch proteomischer/katalytischer Ebene wurde eine umfassende Charakterisierung embryonaler Hepatozyten in Kultur durchgeführt.

Untersucht wurde der Einfluß verschiedener Matrices (Collagen I, IV, Matrigel, Laminin), feeder-Zellen (3T3, MRC-5, primäre Fibroblasten) und Wachstumsfaktoren einzeln oder in Kombination (Thrombopoietin, Hepatocyte-, Epidermal- und Transforming Growth Factor) auf die Proliferation und Differenzierung der embryonalen Hepatozyten.

Durch mechanische Isolation der Hepatozyten aus dem Lebergewebe konnten stets Zellen mit einer Vitalität von über 95% gewonnen werden. Nach einer initialen Phase von 24h mit serumhaltigen Medium war es erfolgreich möglich, embryonale Hepatozyten unter definierten Kulturbedingungen über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen serumfrei zu kultivieren.

Von allen eingesetzten Beschichtungen und feeder-Zellen wurde eine maximale, 30fache Zellvermehrung nach 12 Tagen in Kultur auf 3T3 feeder-Zellen mit Zusatz von Thrombopoietin (TPO) erreicht. Kulturen auf Collagen IV ergaben von allen benutzten Proteinmatrices die höchste Zellvermehrung (7fach) mit Zusatz von TPO und Hepatocyte Growth Factor. Es konnte erstmalig ein proliferativer Effekt von TPO auf embryonale Hepatozyten in Kultur gezeigt werden.

Die Proliferation und Differenzierung embryonaler Hepatozyten in Kultur werden eindeutig von der Art der verwendeten Kulturmatrix bzw. feeder-Zellen beeinflusst. Es kann dabei zwischen zur Differenzierung führenden (Collagen I) und die Proliferation unterstützenden (Collagen IV) Matrices unterschieden werden.

Die auf 3T3 feeder-Zellen mit TPO kultivierten Zellen wiesen ein RNA Expressionsprofil ähnlich dem adulter Hepatozyten auf. Zusätzlich wurden Differenzierungsmarker nachgewiesen: Es konnte Albuminsekretion (in Konzentrationen wie die adulter Hepatozyten) über einen Untersuchungszeitraum

von 30 Tagen beobachtet werden; durch Immuncytochemie wurden Albumin, GST und verschiedene Cytochrome detektiert; es konnte Cytochrom-P450 Aktivität bis zu 12 Tage in Kultur nachgewiesen werden (EROD, PROD); ECOD Aktivität konnte bis zu 2 Tage in Kultur festgestellt werden.

Erstmalig wurde gleichzeitig eine deutliche Zunahme der Zellzahl und die Expression wesentlicher leberspezifischer Differenzierungsmerkmale ähnlich denen adulter Hepatozyten von embryonalen Hepatozyten in Kultur erreicht mit Hilfe der Kultur auf feeder-Zellen und Zusatz von TPO. Eine Verbesserung der Kulturbedingungen embryonaler Hepatozyten wurde daher durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erreicht.

6 Abkürzungen

α	alpha <i>oder</i> Irrtumswahrscheinlichkeit
a.d.	aqua distillata
AFP	α -Fetoprotein
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CYP450	Cytochrom P450
Cy3	Cyanine-3-Tyramide
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIF	Hybridomed DIF 1000
DMEM	Dulbecco`s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	Embryonalentwicklungstag
ECOD	7-Ethoxycoumarin-O-deethylase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbend assay
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase
FCS	Fötales Kälberserum
FIB	primäre Fibroblasten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm <i>oder</i> Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₀	Nullhypothese
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HGF	hepatocyte growth factor
l	Liter

M	Molar
m	milli <i>oder</i> Meter
MEM	Minimal Essential Medium
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
min	Minute
μ	Mikro <i>oder</i> Mittelwerte einer Grundgesamtheit
n	nano <i>oder</i> Anzahl der Meßwerte
N	Normal
NBT/BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblau-tetrazoliumchlorid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PERV	porcine endogenous retro virus
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prüfgröße
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ Konzentration
PROD	7-Pentoxeresorufin-O-depentylase
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde <i>oder</i> Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Mittlerer Fehler (standard error of the mean)
SSC	sodium citrate, sodium chloride
TGF α	transforming growth factor alpha
TPBS	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween
TPO	Thrombopoietin
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
v/v	Volumenteil/Volumenteil
VT	Volumenteil
WE	William`s Medium E
w/v	Gewichtsteil/Volumenteil
x_i	Einzelner Meßwert
\bar{x}	Mittelwert

7 Literaturverzeichnis

Andersen S.B. und Rossing N. (1967). Metabolism of albumin and γ -globulin during albumin infusions and during plasmapheresis. *Scand J Clin Lab Invest* **20**:183-184.

Andersson T. und Förlin L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* **24**:1-20.

Annoni G., Weiner F.R., Colombo M., Czaja M.J., Zern M.A. (1990). Albumin and collagen gene regulation in alcohol- and virus induced human liver disease. *Gastroenterol* **98**:197-202.

Asakura I., Sugimoto M., Watanabe M., Ito K. (1993). Glutathione S-transferases in primary cultured rat hepatocytes. *Gastroenterol Jpn* **28**(1):34-45.

Aubrecht J., Hirsch-Ernst K.I., Becker-Rabbenstein V., Kahl G.F., Taniguchi H., Hohne M.W. (1995). Induction of cytochrome P-4502B1-related mouse cytochrome P-450 and regulation of its expression by epidermal growth factor/transforming growth factor alpha in primary hepatocyte culture. *Biochem Pharmacol* **50**(6):781-785.

Babcock G.T. und Wikström M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**:301-309.

Bader A., Zech K., Crome O., Christians U., Ringe B., Pichlmayr R., Sewing K.F. (1994). Use of organotypical cultures of primary hepatocytes to analyse drug biotransformation in man and animals. *Xenobiotica* **24**(7):623-633.

Bader A., Knop E., Boker K.H., Crome O., Frühauf N., Gonschior A.K., Christians U., Esselmann H., Pichlmayr R., Sewing K.F. (1996). Tacrolimus (FK 506)

biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **353**(4):461-473.

Baker T.K., Carfagna M.A., Gao H., Dow E.R., Li Q., Searfoss G.H., Ryan T.P. (2001). Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **14**(9):1218-1231.

Ballard F.J. und Hanson R.W. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem J* **104**(3):866-871.

Ballard F.J. und Oliver I.T. (1963). Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochim Biophys Acta* **71**:578-588.

Ballard F.J. und Oliver I.T. (1965). Carbohydrate metabolism in liver from foetal and neonatal sheep. *Biochem J* **95**:191-200.

Barr J., Weir A.J., Brendel K., Sipes I.G. (1991). Liver slices in dynamic organ culture I. An alternative *in vitro* technique for the study of rat hepatic drug metabolism. *Xenobiotica* **21**:331-339.

Berry M.N. und Friend D.S. (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* **43**:506-520.

Bevan B.R., Holton J.B., Lathe G.H. (1965). The effect of pregnanediol and pregnanediol glucuronide on bilirubin conjugation by rat liver slices. *Clin Sci* **29**(2):353-361.

Bissell D.M., Levine G.A., Bissell M.J. (1978). Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Am J Physiol* **234**(3):C122-130.

Bissell D.M., Arenson D.M., Maher J.J., Roll F.J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* **79**:801-812.

Blaauboer B.J., Wortelboer H.M., Mennes W.C. (1990). The use of liver cell cultures derived from different mammalian species in *in vitro* toxicological studies. *ATLA* **18**:251-258.

Block G.D., Locker J., Bowen W.C., Petersen B.E., Katyal S., Strom S.C., Riley T., Howard T.A., Michalopoulos G.K. (1996). Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF α in a chemically defined (HGM) Medium. *J Cell Biol* **132**(6):1133-1149.

Blouin A., Bolender R.P., Weibel E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in rat liver parenchyma. *J Cell Biol* **72**:441-455.

Bouwens L., Marinelli A., Kuppen P.J.K., Eggermont A.M.M., Van de Velde C.J.A., Wisse E. (1990). Electron microscopic observations on the accumulation of large granular lymphocytes (pit cells) and Kupffer cells in the liver of rats treated with continuous infusion of interleukin-2. *Hepatology* **12**:1365-1370.

Bozak K.R., Yu H., Sirevag R., Christoffersen R.E. (1990). Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc Nat Acad Sci USA* **87**:3904-3908.

Brenner D.A., Koch K.S., Leffert H.L. (1989). Transforming growth factor- α stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes. *DNA* **8**(4):279-285.

Brodie B., Axelrod J., Cooper J.R., Gaudette L., LaDu B.N., Mitoma C., Udenfriend S. (1955). Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* **121**:603-604.

Brown S.E., Guzelian C.P., Schuetz E., Quattrochi L.C., Kleinman H.K., Guzelian, P.S. (1995). Critical role of extracellular matrix on induction by phenobarbital of

cytochrome P450 2B1/2 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Lab Invest* **73**(6):818-827.

Burczynski M.E., McMillian M., Ciervo J., Li L., Parker J.B., Dunn RT, Hicken S., Farr S., Johnson M.D. (2000). Toxigenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol Sci* **58**(2):399-415.

Cadefau J., Bollen M., Stalmans W. (1997). Glucose-induced glycogenesis in the liver involves the glucose-6-phosphate-dependent dephosphorylation of glycogen synthase. *Biochem J* **322**:745-750.

Cardell R.R. und Cardell E.L.S. (1993). Carbohydrates and Glycogen Metabolism. In: LeBouton AV, ed. Molecular and cell biology of the liver. Boca Raton: CRC Press, 85-116.

Carriere R. (1969). The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. *Int Rev Cytol* **25**:201-277.

Chen S.C., Mullon C., Kahaku E., Watanabe F., Hewitt W., Eguchi S., Middleton Y., Arkadopoulos N., Rozga J., Solomon B., Demetriou A.A. (1997). Treatment of severe liver failure with a bioartificial liver. *Ann N Y Acad Sci* **831**:350-360.

Chenery R.J. (1988). The utility of hepatocytes in drug metabolism studies. *Prog Drug Metabol* **11**:217-269.

Ching K.Z., Tenney K.A., Chen J., Morgan E.T. Suppression of constitutive cytochrome P450 gene expression by epidermal growth factor receptor ligands in cultured rat hepatocytes (1996). *Drug Metab Dispos* **24**(5):542-546.

Cohen M.B. und Feyereisen R. (1995). A cluster of cytochrome P450 genes of the CYP6 family in the house fly. *DNA Cell Biol* **14**:73-82.

Coon H.G. und Weiss M.C. (1969). Sendai produced somatic cell hybrids between L cell strains and between liver and L cells. *Wistar Inst Symp Monogr* **9**:83-96.

Croci T., Williams G.M. (1985). Activities of several phase I and phase II xenobiotic biotransformation enzymes in cultured hepatocytes from male and female rats. *Biochem Pharmacol* **34**:3029-3035.

Curran T.R., Bahner R.I., Oh W., Gruppuso P.A. (1993). Mitogen-independent DNA synthesis by fetal rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* **209**(1):53-57.

De Juan C., Sanchez A., Nakamura T., Fabregat, I., Benito M. (1994). Hepatocyte growth factor up-regulates met expression in rat fetal hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **204**(2):1364-1370.

De La Vega F.M. und Mendoza-Figueroa (1991). Effects of probucol on lipid metabolism and secretion in long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1081**(3):293-300.

De Sauvage F.J., Hass P.E., Spencer S.D., Malloy B.E., Gurney A.L., Spencer S.A., Darbonne W.C., Henzel W.J. Wong S.C., Kuang W.-J., Oles K.J., Hultgren B., Solberg Jr. L.A., Goeddel D.V., Eaton D.L. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**:533-538.

Deutsch H.F. (1991). Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv Cancer Res* **56**:253-312.

Dogterom P. (1993). Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab and Disposition* **21**(4):699-704.

Domagk G.F. (1978). Biochemie der Leber. In: Domagk G.F., Eisenburg J., Heldt H.W. Hrsg. Leber. München: Urban und Schwarzenberg, 99-160.

Donato M.T., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (1999). Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **31**(3):542-549.

Donato M.T., Gomez-Lechon M.J., Castell J.V. (1993). A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* **213**(1):29-33.

Donato M.T., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. (1994). Cytochrome P450 activities in pure and co-cultured rat hepatocytes. Effect of model inducers. *In Vitro Cell Dev Biol* **30A**:825-832.

Drenckhahn D., Fahimi D., Fleischhauer K. (1994). Leber und Gallenblase. In: Drenckhahn D, Zenker W, Hrsg. Benninghoff Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 1. 15. Auflage. ORT: Urban und Schwarzenberg, 901-925.

Dubois A.M. (1963). The embryonic liver. In: Rouiller Ch, ed. The liver. New York: Academic Press, 1-39.

Dunn J.C., Tompkins R.G., Yarmush M.L. (1991). Long-term *in vitro* function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* **7**(3):237-245.

Eurotransplant (2001). <http://www.eurotransplant.nl>

Evans V.J., Earle W.R., Wilson E.P., Waltz H.K., Mackey C.J. (1952). The growth *in vitro* of massive cultures of liver cells. *J Nat Cancer Inst* **12**:1245-1256.

Fabrikant J.I. (1968). The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* **36**(3):551-565.

Fabrikant J.I. (1969). Studies on cell population kinetics in the regenerating liver. *Natl Cancer Inst Monogr* **30**:1036-1042.

Feracci H., Connolly T.P., Margolis R.N., Hubbard A.L. (1987) The establishment of hepatocyte cell surface polarity during fetal liver development. *Dev Biol* **123**(1):73-84.

Feyereisen R. (1993). Cytochrome P450 in insects. In: Schenkman J.B. und Griem H. eds. Cytochrome P450. Berlin, Springer-Verlag, 311-24.

Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**(4995):767-773.

Garcia M.C., Thangavel C., Shapiro B.H. (2001). Epidermal growth factor regulation of female-dependent CYP2A1 and CYP2C12 in primary rat hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos* **29**(2):111-120.

Garfinkel D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77**:493-509.

Gerlach J.C., Lemmens P., Schon M., Janke J., Rossaint R., Busse B., Puhl, G., Neuhaus P. (1997). Experimental evaluation of a hybrid liver support system. *Transplant Proc* **29**(1-2):852.

Gerschenson L.E. und Casanello D. (1968). Metabolism of rat liver cells cultured in suspension: insulin and glucagon effects on glycogen level. *Biochem Biophys Res Commun* **33**(4):584-589.

Gomez-Lechon M.J., Jover R., Donato T., Ponsoda X., Rodriguez C., Stenzel K.G., Klocke R., Paul D., Guillen I., Bort R., Castell J.V. (1998). Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J Cell Physiol* **177**(4):553-562.

Grant A.G. und Billing B.H. (1977). The isolation and characterization of a bile ductule cell population from normal and bile-duct ligated rat livers. *Br J Exp Pathol* **58**(3):301-310.

Greengard O., Federman M., Knox W.E. (1972). Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J Cell Biol* **52**(2):261-272.

Gruppuso P.A., Boylan J.M., Bienieki T.C., Curran T.R. (1994). Evidence for a direct hepatotrophic role for insulin in the fetal rat: implication for the impaired hepatic growth seen in fetal growth retardation. *Endocrinology* **134**(2):769-775.

Gruppuso P.A., Awad M., Bienieki T.C., Boylan J.M., Fernando S., Faris R.A. (1997). Modulation of mitogen-independent hepatocyte proliferation during the perinatal period in the rat. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **33**(7):562-568.

Guzelian P.S., Bissel D.M., Meyer U.A. (1977). Drug metabolism in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Gastroenterol* **72**:1232-1239.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **249**(22):7130-7139.

Hamamoto R., Kamihira M., Ijima S. (1999). Growth and differentiation of cultured fetal hepatocytes isolated from various developmental stages. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**(2):395-401.

Hamilton W.J. and Mossman (1972). Human Embryology, 4th edition. W. Heffer and Sons, Cambridge.

Hentsch B., Lyons I., Li R., Hartley L., Lints T.J., Adams J.M., Harvey R.P. (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev* **10**(1):70-79.

Hernandez A., Lopez M.L., Chamorro G., Mendoza-Figueroa T. (1993). Inhibition of lipid synthesis and secretion in long-term cultures of adult rat hepatocytes by alpha-asarone. *Planta Med* **59**(2):121-124.

Higashiyama S., Horikawa M., Yamada K., Ichino N., Nakano N., Nakagawa T., Miyagawa J., Matsushita N., Nagatsu T., Taniguchi N., Ishiguro H (1997). A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem* **122**(3):675-680.

Higgins G.M. und Anderson R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. I: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**:186-202.

Hilberg F., Aguzzi A., Howells N., Wagner E.F. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**(6442):179-181.

Hirata K., Yoshida Y., Shiramatsu K., Freeman A.E., Hayasaka H. (1983). Effects of laminin, fibronectin and type IV collagen on liver cell cultures. *Exp Cell Biol* **51**:121-129.

Hoheisel J.D., Fellenberg K., Brors B., Diehl F., Hauser N., Vingron M. (2001). Transkriptionelle Untersuchungen auf DNS-Microarrays. *BIOforum* **12**:908-910.

Hohne M., Becker-Rabbenstein V., Kahl G.F., Taniguchi H. (1990). Regulation of cytochrome P-450 CYP1A1 gene expression and proto-oncogene expression by growth factors in primary hepatocytes. *FEBS Lett* **273**(1-2):219-222.

Hommes F.A., Oudman-Richters A.R., Molenaar I. (1971). The preparation of isolated fetal rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* **244**:191-199.

Honda M., Kaneko S., Kawai H., Shiota Y., Kobayashi K. (2001). Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterol* **120**(4):955-966.

Hong W. The plasma membrane and intercellular junctions. In: LeBouton AV, ed. *Molecular and Cell Biology of the Liver*. Boca Raton: CRC Press, 1993:85-116.

Houssaint E. (1980). Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* **9**(5):269-279.

Hunt T., Luca F.C., Ruderman J.V. (1992). The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol* **116**(3):707-724.

Ikawa M. und Shozen Y. (1990). Quantification of acute phase proteins in rat serum and in the supernatants of cultured rat hepatoma cell line and cultured primary hepatocytes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Imm Meth* **134**:101-106.

Ito N., Kawata S., Tamura S., Kiso S., Tsushima H., Damm D., Abraham J.A., Higashiyama S., Taniguchi N., Matsuzawa Y. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **198**(1):25-31.

Jakoby W.B. (1978). The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxication proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **46**:383-414.

Jakoby W.B. und Habig W.H. (1980). Glutathione transferases. In: Jakoby W.B. ed. *Enzymatic basis of detoxication*. Vol. 2. New York, Academic Press, 63-94.

Jakoby W.B. (1994). Detoxication: Conjugation and hydrolysis. In: Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jakoby W.B., Schachter D., Shafritz D.A., eds. *The Liver. Biology and Pathobiology*. Third Edition. New York, Raven Press, 791-818.

James N.H., Molloy C.A., Soames A.R., French N.J., Roberts R.A. (1992). An *in vitro* model of rodent nongenotoxic hepatocarcinogenesis. *Exp Cell Res* **203**(2):407-419.

Jelkmann W. (2001). The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**(7):791-801.

John D.W. und Miller L.L. (1969). Regulation of net biosynthesis of serum albumin and acute phase plasma proteins. Induction of enhanced net synthesis of fibrinogen, alpha1-acid glycoprotein, alpha2 (acute phase)-globulin, and haptoglobin by amino acids and hormones during perfusion of the isolated normal rat liver. *J Biol Chem* **244**:6134-6142.

Jung J., Zheng M., Goldfarb M., Zaret K.S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**(5422):1998-2003.

Kaddurah-Daouk R., Greene J.M., Baldwin A.S., Kingston R.E. (1987). Activation and repression of mammalian gene expression by the c-myc protein. *Genes Dev* **1**(4):347-357.

Kaighn M.E. (1971). Synthesis of serum proteins by human liver clones. *In Vitro* **6**(5):371.

Kan M., Huang J.S., Mansson P.E., Yasumitsu H., Carr B., McKeehan W.L. (1989). Heparan-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(19):7432-7436.

Karin M., Liu Z., Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2):240-246.

Kato T., Satoh S., Okabe H., Kitahara O., Ono K., Kihara C., Tanaka T., Tsunoda T., Yamaoka Y., Nakamura Y., Furukawa Y. (2001). Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasia* **3**(1):4-9.

Katz J., Bonorris G., Okuyama S., Sellers A.N. (1967). Albumin synthesis in perfused liver of normal and nephrotic rats. *Am J Physiol* **212**:1255-1260.

Kaushansky K., Lok S., Holly R.D., Broudy V.C., Lin N., Bailey M.C., Forstrom J.W., Oort P.J., Hagen F.S., Roth G.J., Papayannopoulou T., Foster D.C. (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**:568-571.

Kesel A.B., Junge M.M., Nachtigall W. (1999). Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler. Birkhäuser, Basel.

Khaoustov V.I., Risin D., Pellis N.R., Yoffe B. (2001). Microarray analysis of genes differentially expressed in HepG2 cells cultured in simulated microgravity: preliminary report. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **37**(2):84-88.

Kimoto S. (1959). The artificial liver experiments and clinical application. *ASAIO Trans* **5**:102.

Klingenberg M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**:376-386.

Knazek R.A., Gullino P.M., Kohler P.O., Dedrick R.L. (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. *Science* **178**:65-67.

Koebe H.G., Pahernik S., Eyer P., Schildberg F.W. (1994). Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica* **24**(2):95-107.

Köhler W., Schachtel G., Voleske P. (1995). Biostatistik. Springer, Berlin.

Komura E., Matsumara T., Kato T., Tahara T., Tsunoda Y., Sawada T. (1998). Thrombopoietin in patients with hepatoblastoma. *Stem Cells* **16**(5):329-333.

Kuddus R., Patzer J.F., Lopez R., Mazariegos G.V., Meighen B., Kramer D.J., Fung J.J., Rao A.S. (2001). Valuation of transmission of porcine endogenous retrovirus into patients subjected to hemoperfusion using an extracorporeal bioartificial liver support system. *Transplant Proc* **33**(1-2):1976.

Kuiper J., Brouwer A., Knook D.L., van Berkel T.J.C. (1994). Kupffer and sinusoidal endothelial cells. In: Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jakoby W.B., Schachter D., Shafritz D.A., eds. *The Liver. Biology and Pathobiology*. Third Edition. New York, Raven Press, 791-818.

Langenbach R., Malick L., Tompa A., Kuszynski C., Freed H., Huberman E. (1979). Maintenance of adult rat hepatocytes on C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res* **39**(9):3509-3514.

Lau W.Y., Lai P.B., Leung M.F., Leung B.C., Wong N., Chen G., Leung T.W., Liew C.T. (2000). Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analysis. *Oncol Res* **12**(2):59-69.

Leffert H.L. und Paul D. (1972). Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *J Cell Biol* **52**(3):559-568.

Lewis D.F.V. (1996). *Cytochromes P450. Structure, Function and Mechanism*. Taylor and Francis, London.

Liao W.S., Conn A.R., Taylor J.M. (1980). Changes in rat alpha 1-fetoprotein and albumin mRNA levels during fetal and neonatal development. *J Biol Chem* **255**(21):10036-10039.

Lok S., Kaushansky K., Holly R.D., Kuijper J.L., Lofton-Day C.E., Oort P.J., Grant F.J., Heipel M.D., Burkhead S.K., Kramer J.M., Bell L.A., Sprecher C.A., Blumberg H., Johnson R., Prunkard D., Ching A.F.T., Mathewes S.L., Bailey M.C., Forstrom J.W., Buddle M.M., Osborn S.G., Evans S.J., Sheppard P.O., Presnell S.R., O'Hara P.J., Hagen F.S., Roth G.J., Foster D.C. (1994). Cloning and

expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* **369**:565-568.

Lu T., Liu J., LeCluyse E.L., Zhou Y.S., Cheng M.L., Waalkes M.P. (2001). Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* **59**(1):185-192.

Mannervik B. und Danielson U.H. (1988). Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* **23**(3):283-337.

Margulis M.S., Erukhimov E.A., Andreiman L.A. (1989). Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency. *Resuscitation* **18**:85-94.

Margulis M.S., Erukhimov E.A., Andreiman L.A., Kuznetsov K.A., Viksana L.M., Kuznetsov A.I., Devyatov V.V. (1990). Hemoperfusion through suspension of cryopreserved hepatocytes in a treatment of patients with acute liver failure. *Res Surg* **2**(3):99-102.

Martinez-Hernandez A. and Amenta P.S. (1993). Morphology, Localization, and Origin of the Hepatic Extracellular matrix. In: Zern MA, Reid LM, eds. *Extracellular Matrix; Chemistry, Biology, and Pathobiology with Emphasis on the Liver*. New York, Marcel Dekker, 255-327.

Martinez-Hernandez A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* **51**(1):57-74.

Mason H.S., Folwks, W.L., Peterson E. (1955). Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc* **77**:2914-2915.

Matsumara K.N., Guevara G.R., Huston H., Hamilton W.L., Rikimaru M., Yamasaki G., Matsumara M.S. (1987). Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery* **101**(1):99-103.

McGowan J.A., Strain A.J., Bucher N.L. (1981). DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J Cell Physiol* **108**(3):353-363.

Mead J.E. und Fausto N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(5):1558-1562.

Michalopoulos G., Houck K.A., Dolan M.L., Leutke N.C. (1984). Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* **44**(10):4414-4419.

Michalopoulos G., Bowen W.C., Zajac V.F., Beer-Stolz D., Watkins S., Kostrubsky V., Strom S.C. (1999). Morphogenic events in mixed cultures of rat hepatocytes and nonparenchymal cells maintained in biological matrices in the presence of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology* **29**(1):90-100.

Miyai K. (1991). Structural organization of the liver. In: Meeks R.G., Harrison S.D., Bull R.J., eds. *Hepatotoxicology*. Boca Raton, CRC Press, 1-65.

Montesano R., Matsumoto K., Nakamura T., Orci L. (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* **67**(5):901-908.

Moorman A. F., De Boer P. A., Evans D., Charles R., Lamers W. H. (1990). Expression patterns of mRNAs for alpha-fetoprotein and albumin in the developing rat: the ontogenesis of hepatocyte heterogeneity. *Histochem J* **22**(12):653-660.

Motta P., Muto M., Fujita T. (1978). *The Liver: An atlas of scanning electron microscopy*. Igaku-Shoin.

Mukhtar H. und Khan W.A. (1989). Cutaneous cytochrome P-450. *Drug Metab Rev* **20**(2-4):657-673.

Murray N.A., Watts T.L., Roberts I.A.G. (2000). Thrombopoietin in the fetus and neonate. *Earl Hum Dev* **59**:1-12.

Nakajima H. und Shimbara N. (1996). Functional maintenance of hepatocytes on collagen gel cultured with simple serum-free medium containing sodium selenite. *Biochem Biophys Res Com* **222**:664-668.

Nakamura T., Nawa K., Ichihara A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Com* **122**(3):1450-1459.

Naldini L., Vigna E., Narsimhan R.P., Gaudino G., Zarnegar R., Michalopoulos G.K., Comoglio P.M. (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* **6**(4):501-504.

Nayak N.C. und Mital I. (1977) The dynamics of alpha-fetoprotein and albumin synthesis in human and rat liver during normal ontogeny. *Am J Pathol* **86**(2):359-374.

Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D.W. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**:1-51.

Neufeld N.D., Scott M., Kaplan S.A. (1980). Ontogeny of the mammalian insulin receptor. Studies of human and rat fetal liver plasma membranes. *Dev Biol* **78**(1):151-160.

Neuzil D., Rozga J., Moscioni A.D., Ro M.S., Hakim R., Arnaout W.S., Demetriou A.A. (1993). Use of a novel bioartificial liver in a patient with acute liver insufficiency. *Surgery* **113**(3):340-343.

Nickerson H.J., Silberman T.L., McDonald T.P. (1980). Hepatoblastoma, thrombocytosis, and increased thrombopoietin. *Cancer* **45**(2):315-317.

Nyberg S.L., Hibbs J.R., Hardin J.A., Germer J.J., Persing D.H. (1999). Transfer of porcine endogenous retrovirus across hollow fiber membranes: significance to a bioartificial liver. *Transplantation* **67**(9):1251-1255.

Okabe H., Satoh S., Kato T., Kitahara O., Yanagawa R., Yamaoka Y., Tsunoda T., Furukawa Y., Nakamura Y., (2001). Genome wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* **61**(5):2129-2137.

Paine A.J. (1981). Hepatic cytochrome P-450. *Essays Biochem* **17**:85-126.

Paine A.J. (1990). The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system. *Chem Biol Interact* **74**:1-31.

Patience C., Takeuchi Y., Weiss R.A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* **3**(3):282-286.

Peters T. (1975). Serum albumin. In: Putnam F.W. ed. The plasma proteins: Structure, function and genetic control. New York, Academic Press.

Pietrangelo A. und Shafritz D.A. (1994). Homeostatic regulation of hepatocyte nuclear transcription factor (HNF)-1 expression in cultured hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(1):182-186.

Pietrangelo A. und Shafritz D.A. (1994). Gene expression during pathophysiologic states. In: Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jakoby W.B., Schachter D., Shafritz D.A., eds. The Liver. Biology and Pathobiology. Third Edition. New York: Raven Press, 85-98.

Pitot H.C., Peraino C., Morse P.A., Potter V.R. (1964). Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natl Cancer Inst Monogr* **13**:229-245.

Puga A., Maier A., Medvedovic M. (2000). The transcriptional signature of dioxin in human HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* **60**(8):1129-1142.

Qian S., Fu F., Li W., Chen Q., de Sauvage F.J. (1998). Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout. *Blood* **92**:2189-2191.

Rappaport A.M., Borowy Z.J., Loughheed W.M., Lotto W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anat Rec* 11-33.B.

Reddy J.K. und Rao M.S. (1987). Hepatic ultrastructure and adaption. In: Farber E., Phillips M.J., Kaufman N. eds. Pathogenesis of liver diseases. Baltimore: Williams and Wilkins, 11-42.

Reichhart D., Salaun J.P., Benveniste I., Durst F. (1979). Induction by manganese, ethanol, phenobarbital, and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissue. *Arch Biochem Biophys* **196**(1):301-303.

Reid L.M., Fiorino A.S., Sigal S.H., Brill S., Holst P.A. (1992). Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology* **15**(6):1198-203.

Reid L.M., Jefferson D.M. (1984). Culturing hepatocytes and other differentiated cells. *Hepatology* **4**(3):548-559B.

Richman R.A., Claus T.H., Pilgis S.J., Friedmann D.L. (1976). Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**(10):3589-3593.

Ritchie A., Gotoh A., Gaddy J., Braun S.E., Broxmeyer H.E. (1997). Thrombopoietin upregulates the promotor conformation of p53 in a proliferation-

independent manner coincident with a decreased expression of Bax: potential mechanism for survival enhancing effects. *Blood* **90**(11):4394-4402.

Rojikind M. and Greenwell P. (1994). The Extracellular Matrix of the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, eds. The Liver. Biology and Pathobiology. Third Edition. New York: Raven Press, 843-868.

Rojkind M., Gatmaitan Z., Mackensen S., Giambrone M.-A., Ponce P., Reid L.M. (1980). Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal hepatocytes. *J Cell Biol* **87**:225-263.

Rothschild M.A., Oratz M., Mongelli J., Schreiber S.S. (1969). Effect of albumin concentration on albumin synthesis in the perfused liver. *Am J Physiol* **216**(5):1127-1130.

Rothschild M.A., Oratz M., Schreiber S.S. (1988). Serum albumin. *Hepatology* **8**(2):385-401.

Rozga J., Podesta L., Le Page E., Hoffman A., Morsiani E., Sher L., Woolf L., Makowka L., Demetriou A.A. (1993a). Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure. *Lancet* **342**:898-899.

Rozga J., Holzmann M.D., Ro M.S., Griffin D.W., Neuzil D.F., Giorgio T., Moscioni A., Demetriou A.A. (1993b). Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* **217**(5):502-511.

Runge D., Runge D.M., Drenning S.D., Bowen W.C., Grandis J.R., Michalopoulos G.K. (1998). Growth and differentiation of rat hepatocytes: changes in transcription factors HNF-3, HNF-4, STAT-3, and STAT-5. *Biochem Biophys Res Commun* **250**(3):762-768.

Sato H., Funahashi M., Kristensen D.B., Tateno C., Yoshizato K. (1999). Pleiotrophin as a Swiss 3T3 cell-derived potent mitogen for adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res* **246**(1):152-164.

Scandurro A.B., Weldon C.W., Figueroa Y.G., Alam J., Beckman B.S. (2001). Gene microarray analysis reveals a novel hypoxia signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* **19**(1):129-135.

Schaper F., Siewert E., Gomez-Lechon M.J., Gatsios P., Sachs M., Birchmeier W., Heinrich P.C., Castell J. (1997). Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett* **405**(1):99-103.

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**(5235):467-470.

Schena M. und Davis R.W. (1999). Genes, genomes, and chips. In: Schena M. ed. DNA Microarrays. Oxford. University Press, 1-16.

Schmidt C., Bladt F., Goedecke S., Brinkmann V., Zschiesche W., Sharpe M., Gherardi E., Birchmeier C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**:699-702.

Schmid P. und Schulz W.A. (1990). Coexpression of the c-myc protooncogene with alpha-fetoprotein and albumin in fetal mouse liver. *Differentiation* **45**(2):96-102.

Schuetz E.G., Li D., Omiecinski C.J., Muller Eberhard U., Kleinman H.K., Elswick B., Guzelian P.S. (1988). Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* **134**:309-323.

Seglen P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* **13**:29-83.

Seyer J.M., Hutcheson E.T., Kang A.H. (1977). Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* **59**(2):241-248.

Seifter S. und England S. (1994). Energy Metabolism. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver. Biology and Pathobiology*. Third Edition. New York: Raven Press. 323-364.

Shaw M.K., Newton R.S., Sliskovic D.R., Roth B.D., Ferguson E., Krause B.R. (1990). Hep-G2 cells and primary rat hepatocytes differ in their response to inhibitors of HMG-CoA Reductase. *Biochem Biophys Res Com* **170**(2):726-734.

Sherratt A.J., Banet D.E., Prough R.A. (1990). Glucocorticoid regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon induction of Cytochrome P450IA1, glutathione S-transferases, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured fetal rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* **37**(2):198-205.

Shirotta Y., Kaneko S., Honda M., Kawai H.F., Kobayashi K. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* **33**(4):832-840.

Siddiqui M.U., Benatmane S., Zacharyus J.L., Plas C. (1999). Gap junctional communication and regulation of the glycogenic response to insulin by cell density and glucocorticoids in cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology* **29**(4):1147-1155.

Sirica A.E. und Pitot H.C. (1979). Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. *Pharmacol Rev* **31**(3):205-228.

Smith B.R., Plummer J.L., Wolf C.R., Philpot R.M., Bend J.R. (1982). p-Xylene metabolism by rabbit lung and liver and its relationship to the selective destruction of pulmonary cytochrome P-450. *J Pharmacol Exp Ther* **223**(3):736-742.

Stamatoglou S.C. und Hughes R.C. (1994). Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation. *Faseb J* **8**(6):420-427.

Stöcker E. und Heine W.D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol* **144**(4):400-408.

Stöhr G., Deimann W., Fahimi H.D. (1978). Peroxidase-positive endothelial cells in the sinusoids of mouse livers. *J Histochem Cytochem* **26**(5):409-411.

Stryer L. (1994). Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Sussman N.L. und Kelly J.H. (1993). Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device. *Artif Organs* **17**(1):27-30.

Sussman N.L., Finegold M.J., Kelly J.H. (1992). Recovery from syncytial giantcell hepatitis (SCGH) following treatment with an extracorporeal liver assist device (ELAD). *Hepatology* **16**(2):51A.

Tackels-Horne D., Goodman M.D., Williams A.J., Wilson D.J., Eskandari T., Vogt L.M., Boland J.F., Scherf U., Vockley J.G. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* **92**(2):395-405.

Talbot N.C., Rexroad C.E., Powell A.M., Pursel V.G., Caperna T.J., Ogg S.L., Nel N.D. (1994a). A continuous culture of pluripotent fetal hepatocytes derived from the 8-day epiblast of the pig. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**(12):843-850.

Talbot N.C., Pursel V.G., Rexroad C.E., Caperna T.J., Powell A.M., Stone R.T. (1994b). Colony isolation and secondary culture of fetal porcine hepatocytes on STO feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A**(12):851-858.

Thomassin H., Bois-Joyeux B., Delille R., Ikonomova R., Danan J.L. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor, hepatocyte nuclear factor 3, and CCAAT/enhancer binding protein control the far-upstream enhancer of the rat alpha-fetoprotein gene. *DNA Cell Biol* **15**(12):1063-1074.

Thurman R.G. und Kauffman F.C. (1980). Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol Rev* **31**(4):229-251.

Tracht M.E., Tallal L., Tracht D.G. (1967). Intrinsic hepatic control of plasma albumin concentration. *Life Sci* **6**:2621-2628.

Tsutsumi T., Nakao K., Mitsuoka S., Hamasaki K., Tsuruta S., Shima M., Nakata K., Tamaoki T., Nagataki S. (1993). Regulation of albumin and α -fetoprotein gene expression by colloid osmotic pressure in human hepatoma cells. *Gastroenterol* **104**(1):256-262.

Vinicor F. und Kiedrowski L. (1982). Characterization of the hepatic receptor for insulin in the perinatal rat. *Endocrinology* **110**(3):782-790.

Wang L., Sun J., Li L., Mears D., Horvat M., Sheil A.G. (1998). Comparison of porcine hepatocytes with human hepatoma (C3A) cells for use in a bioartificial liver support system. *Cell Transplant* **7**(5):459-468.

Watanabe F.D., Mullon C.J., Hewitt W.R., Arkadopoulos N., Kahaku E., Eguchi S., Khalili T., Arnaout W., Shackleton C.R., Rozga J., Solomon B., Demetriou A.A. (1997). Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* **225**(5):484-494.

Wendling F., Maraskovsky E., Debili N., Florindo C., Teepe M., Titeux M., Methia N., Breton-Gorius J., Cosman D., Vainchenker W. (1994). C-mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* **369**:571-574.

Widmann J.J., Cotran R.S., Fahimi H.D. (1972). Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity. *J Cell Biol* **52**:159-170.

Wilson J.W. und Leduc E.H. (1948). The occurrence and formation of binucleate and multinucleate cells and polyploid nuclei in the mouse liver. *Americ J Anatomy* **82**(3):353-391.

Wilson C.A., Wong S., Müller J., Davidson C.E., Rose T.M., Burd P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* **72**(4):3082-3087.

Wood R.P., Katz S.M., Ozaki C.F., Monsour H.P., Gislason G.T., Kelly J.H., Sussman N.L. (1993). Extracorporeal liver assist device (ELAD): a preliminary report. *Transplant Proc* **25**(4):53-54.

Woodcroft K.J. und Novak R.F. (1998). Xenobiotic-enhanced expression of cytochromes P450 2E1 and 2B in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **26**(4):372-378.

Yamada K., Ichino N., Nishii K., Sawada H., Higashiyama S., Ishihuro H., Nagatsu T. (2000). Characterization of the human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK mRNA. *Gene* **255**:15-24.

Yeoh G.C.T. und Morgan E.H. (1974). Albumin and transferrin synthesis during development in the rat. *Biochem J* **144**:215-224.

Yeoh G.C.T., Wassenburg J.A., Edkins E., Oliver I.T. (1979). Synthesis and secretion of albumin and transferrin by foetal rat hepatocyte cultures. *Biochim Biophys Acta* **565**:347-355.

Zaret K., (1994). Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* **8**(5):526-531.

Zheng Y.W., Taniguchi H., Suzuki Y., Takada K., Fukunaga K., Seino K., Yuzawa K., Otsuka M., Fukao K., Nakauchi H. (2000). Effects of four extracellular matrices associated with growth factors on clonal culture and proliferation of murine fetal hepatocytes. *Transplant Proc* **32**(7):2498-2499.

Ziegler D.M. (1994). Detoxication: Oxidation and reduction. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, eds. The Liver. Biology and Pathobiology. Third Edition. New York: Raven Press, 415-428.

Zucali J.R., McDonald T.P., Gruber D.F., Mirand E.A. (1977). Erythropoietin, Thrombopoietin and colony stimulating factor in fetal mouse liver culture media. *Exp Hematol* **5**(5):385-391.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Deckwer für seine Bereitschaft als Mentor die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Bader für seine zahlreichen Ideen und die Möglichkeit, unter seiner Leitung eigenständig und mit großen Forschungsfreiräumen arbeiten zu können.

Dr. Lothar Just für die Hilfe bei der *in situ* Hybridisierung und der konstruktiven Korrektur dieser Arbeit.

Dr. Frank Stahl, Susann Loose und Rene Schulz für ihre tolle Unterstützung und Vorarbeit bei den Microarrays.

Allen Kollegen und Kolleginnen der Organ- und Gewebekultur.

Meinem Freund Carsten Grethmann.

Lebenslauf

01.06.1972	geboren in Göttingen
1978 bis 1982	Grundschule Hardeggen
1982 bis 1984	Orientierungsstufe Kooperative Gesamtschule Moringen
1984 bis 1991	Otto-Hahn-Gymnasium Göttingen
Mai 1991	Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium Göttingen
1991 bis 1993	Biologieschule Dr. Heinemann Braunschweig
August 1993	Abschluß der Ausbildung an der Biologieschule Dr. Heinemann Braunschweig als „Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin“
September 1993	Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität Göttingen
Oktober 1995	Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Mikrobiologie, anorganische Chemie und physikalische Chemie
Juli 1997	Diplomhauptprüfung im Hauptfach Biochemie sowie den Nebenfächern physikalische Chemie und Mikrobiologie
1997-1998	Anfertigung der Diplomarbeit im Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Abteilung Biochemie Prof. Dr. H.W. Heldt, der Georg-August-Universität Göttingen. Titel der Arbeit: „Auswirkungen induzierter Glycinakkumulation auf den Blattstoffwechsel“
ab Oktober 1998	Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig, Nachwuchsforschergruppe Organ- und Gewebekultur Prof. Dr. A. Bader, Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation